

**Aus der Universitätsfrauen- und Poliklinik der Universität Rostock**

**Direktor: Prof. Dr. med. B. Gerber**

**Glycodelin A -  
Genexpression und Proteinnachweis  
im Gewebe beim Ovarialkarzinom**

**Inauguraldissertation**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades**

**Doktor der Medizin der Medizinischen Fakultät**

**der Universität Rostock – Anstalt des öffentlichen Rechts**



**vorgelegt von**

**Matthias Bätje**

**aus Perleberg**

**Rostock, 2009**

**Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger**

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger  
Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin  
Ernst-Heydemann-Strasse 6  
18057 Rostock

---

## Inhaltsverzeichnis mit Seitenangaben

1	Einleitung .....	6
1.1	Glycodelin A .....	6
1.2	Glycodelin A-Struktur .....	8
1.3	Glycodelin A-Isoformen .....	11
1.4	Glycodelin A Expressions-Areale .....	12
1.4.1	Endometrium .....	13
1.4.2	Ovar .....	14
1.4.3	Mamma .....	15
1.4.4	Hoden .....	15
1.4.5	Tumorerkrankungen .....	16
1.4.6	Schwangerschaft .....	16
1.5	Glycodelin A-Funktionen .....	17
1.5.1	Immunsuppression .....	17
1.5.2	Reproduktion und Schwangerschaft .....	18
1.5.3	Endokrinologie .....	20
1.6	Glycodelin A-Antikörper-Herstellung .....	21
1.7	Ovarialkarzinom .....	22
1.8	Vorarbeiten, Fragestellung und Zielsetzung .....	26
2	Materialien und Methoden .....	28
2.1	Untersuchungsmaterial .....	28
2.1.1	Gewebeproben .....	28
2.1.2	Serum .....	30
2.2	Methoden .....	30
2.2.1	Immunhistochemische Aufarbeitung .....	30
2.2.1.1	Anfertigung der Gefrierschnitte .....	30
2.2.1.2	Prinzipien der immunhistochemischen Reaktion .....	31
2.2.1.3	Immunhistochemische Reaktion .....	32
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	33
2.2.2.1	RNA-Extraktion .....	33
2.2.2.2	Mengenbestimmung der RNA .....	34
2.2.2.3	Reverse Transkriptase-Reaktion .....	35
2.2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	36
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	38
2.3	Statistische Analysen .....	40

3	Ergebnisse .....	42
3.1	Immunhistochemische Untersuchung .....	42
3.1.1	Immunhistochemischer Nachweis von Glycodellin A .....	42
3.1.2	Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe der Primärtumoren .....	42
3.1.3	Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe der Absiedlungsproben .....	43
3.1.4	Immunhistochemische Betrachtung der Primärtumoren in 4 Diagnosegruppen .....	44
3.1.5	Immunhistochemische Betrachtung der Absiedlungsproben in 4 Diagnosegruppen .....	45
3.1.6	Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe von Ovarialkarzinomen .....	45
3.1.7	Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im benignen Tumorgewebe .....	50
3.1.8	Positiv- und Negativkontrolle .....	51
3.2	Molekularbiologischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe .....	52
3.2.1	Molekularbiologische Untersuchung der Primärtumoren .....	52
3.2.2	Molekularbiologische Untersuchung der Absiedlungsproben .....	53
3.2.3	Molekularbiologische Untersuchung der Primärtumoren in 4 Diagnosegruppen .....	54
3.2.4	Molekularbiologische Untersuchung der Absiedlungsproben in 4 Diagnosegruppen .....	54
3.2.5	Molekularbiologische Untersuchung von Glycodelin A im Gewebe von Ovarialkarzinomen .....	55
3.2.6	Positiv- und Negativkontrolle .....	56
4	Diskussion .....	57
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	66
6	Literaturverzeichnis .....	67
7	Abkürzungsverzeichnis .....	88
8	Abbildungsverzeichnis.....	91

9	Tabellenverzeichnis.....	92
10	Herstellerverzeichnis .....	94
10.1	Materialien und Geräte.....	94
10.2	Chemikalien .....	95
11	Thesen .....	96
12	Anhang.....	98
	<b>Lebenslauf</b>	
	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	
	<b>Danksagung</b>	

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Glycodelin A

Glycodelin A ist ein aus 180 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, welches der Familie der Lipocaline bzw. der Calycine zuzuordnen ist. Durch Bindung an Zelloberflächen-Rezeptoren bilden diese Glykoproteine Komplexe mit löslichen Makromolekülen und zeichnen sich hauptsächlich als Transportproteine aus. Aufgrund des Entdeckungsortes im dezidualisierten endometrialen Gewebe, war Glycodelin ursprünglich als Plazentares Protein 14 (PP14) bekannt geworden. Später konnte nachgewiesen werden, dass es ebenfalls vom Ovar, sowie von Knochenmarkszellen sezerniert wird.<sup>1,2</sup> Glycodelin wurde in den letzten Jahrzehnten von verschiedenen Arbeitsgruppen in dargestellten Geweben nachgewiesen (Tab.1). Die Begriffe Plazentares Protein 14 (PP14), Plazentares Alpha-2-Globulin, Progesteron-abhängiges Endometriumprotein (PEP), Alphauterines Protein (AUP), Progesteron-abhängiges Endometriumprotein (PEG), Schwangerschafts-abhängiges Alpha-2-Mikroglobulin (Alpha-2-PEG), Chorion Alpha-2-Mikroglobulin (CAG-2) sind synonym zum Glycodelin A (Tab. 2).<sup>5</sup> Die Glycodelin A-Produktion ist vom Zyklustag abhängig. Zwischen dem fünften und 17. Zyklustag ist weder im Ovar noch im Uterus Glycodelin A nachweisbar.<sup>3</sup> Vier bis fünf Tage nach der Ovulation (LH+4) ist das Glykoprotein messbar.<sup>4</sup> Ab dem 18. Tag des Zyklus steigt die Expression an. Die maximale Ausschüttung in der lutealen Phase hemmt die natürlichen Killerzellen und fördert die Implantation. Ab dem vierten postovulatorischen Tag einer nichtschwangeren Frau steigt die Serumkonzentration von Glycodelin A an, erreicht einen Höhepunkt um den Zeitraum der Menstruation, um in der mittleren follikulären Phase des nächsten Zyklus wieder abzufallen.<sup>3</sup> Es besteht ein Zusammenhang zwischen Reifungsprozess bzw. Stadium des Endometriums und Messwerten des Glycodelin A in der Uterusspülflüssigkeit (Abb. 1).<sup>5,6</sup>

Ort der Entnahme	Zyklusphase	Konzentrationen
Seminalplasma		19-515 µg/ml
Serum (Frauen)	Nicht Schwangere Schwangere, 6-12 SSW Schwangere, ab 24 SSW	15-40 µg/l bis 2200 µg/l bis 200 µg/l
Fruchtwasser	12- 20 SSW	bis 232 mg/l
Nabelschnurblut		15-22 µg/l
Dezidua	Frühe Schwangerschaft Späte Schwangerschaft	41-160 mg/g Protein 60-2700 µg/g Protein
Plazenta	Frühe Schwangerschaft Späte Schwangerschaft	0,25-15 mg/g Protein 3-430 µg/g Protein
Serum	Fertile Frauen Postmenopausale Frauen Männer	13,7–113,4 µg/l 12,7–56,7 µg/l 3,1–53,1 µg/l
Chorionflüssigkeit		570/ 100 mg Gewebe
Ovarzystenflüssigkeit	Fertile Frauen	253,3 µg/l
Endometrium	Proliferative Phase Sekretorische Phase Dezidua	<0,1 mg/g Protein 7,8-23 mg/g Protein 0,8-160 mg/g Protein

Tab. 1: Konzentrationsnachweis von Glycodelin A in verschiedenen Geweben<sup>7,8,9</sup>

Protein	Gewebe, Körperflüssigkeit
Plazentares Alpha-2-Globulin	Plazenta, Amnionflüssigkeit
Plazenta-spezifisches Alpha-2-Mikroglobulin	Humane Feten, Samenblase, Plazenta, Amnionflüssigkeit
Alphauterines Protein	Uterus, Amnionflüssigkeit
Chorion Alpha-2-Mikroglobulin	Chorion, Sperma, Endometrium, Tumoren in Ovar und Uterus
Progestagen-abhängiges Endometriumprotein	Endometrium
Plazentares Protein 14	diverse Gewebe
Progesteron-assoziiertes Endometriumprotein	Knochenmark (mRNA)
Glycodelin A	Endometrium, Amnionflüssigkeit, Ovar
Glycodelin S	Seminalplasma

Tab. 2: Glycodelin A- Synonyme und Untersuchungsmedien<sup>10</sup>

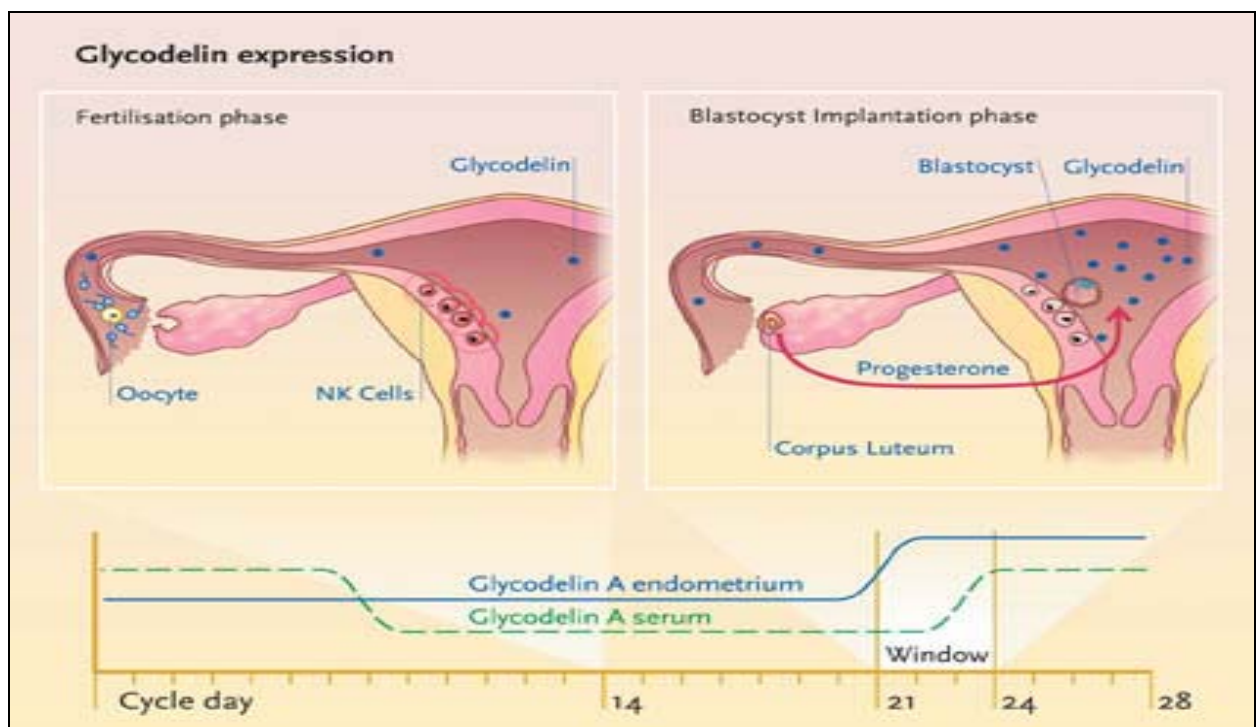


Abb. 1: Die zyklusabhängige Produktion von Glycodelin A<sup>3</sup>

## 1.2 Glycodelin A-Struktur

Van Cong et al. beschrieben die Lage des Gens für PP14 auf Chromosom 9q34. Sie gingen dabei auf die Nähe der Genlokalisierung von Glycodelin A zur Genlokalisierung der AB0-Blutgruppe ein.<sup>11</sup> Bei einer Länge von 5,05 kb ist es in sechs Introns und sieben Exons unterteilt (Abb. 2).<sup>12</sup> Julkunen et al. erhoben folgende Werte: mRNA: 1kb; cDNA: 798bp; 540 Nukleotide.<sup>7</sup> Glycodelin besteht aus 180 Aminosäuren, einschließlich des 18 Aminosäuren langen Signalpeptids. Vier Cysteinreste bilden intermolekulare Disulfidbrücken. Glycodelin ist ein 27-30 kDa schweres Glycoprotein.<sup>12</sup> Die molekulare Masse des Protein-Grundgerüsts des Glycodelin A beträgt 18,787 Da. Der Kohlenhydratanteil beträgt 17,7%.<sup>7</sup> Hokke et al. beschrieben die an der Synthese beteiligten Enzyme: beta-Galactosidase, beta-4-N-Acetyl-Galactosaminyltransferase, alpha-6-Sialyltransferase und alpha-3-Fucosyltransferase.<sup>14</sup> Glycodelin A trägt außerdem mannosereiche Zuckerreste, sowie in Glykoproteinen seltene fucosylierte und sialysierte N,N'-Diacetyllactosediemin-Sequenzen.<sup>15</sup> Neueste Untersuchungen zeigten, dass Glykoproteine aus der Amnionflüssigkeit, z.B. Transferrin und Glycodelin



A, als Inhibitoren der E-selectin-vermittelten (HepG2) Zell-Adhäsion eine Rolle spielen.<sup>16</sup> Die Oligosaccharidbausteine des Glycodelin A und insbesondere die molekulare Größe dieser Glycanstrukturen zeigen sich für die apoptotischen Eigenschaften des Glycodelin A-Moleküls verantwortlich.<sup>17</sup> Die Aminosäuresequenzen von Glycodelin A und beta-Laktoglobulin stimmen zu 43,4% überein (Abb. 3). Die Gensequenz wurde mit Hilfe von *Escherichia coli* und *Pichia pastoris* charakterisiert.<sup>18</sup> Die Bindungsfähigkeit der Beta-Laktoglobuline für Retinol bzw. Retinolsäure ist beim Glycodelin A jedoch nicht gegeben.<sup>7,18,19</sup> Beim Lösen in Wasser zeigen beide Moleküle sehr ähnliche Beta-Faltblatt-Sekundärstrukturen. Beim Lösen in Alkohol werden die Unterschiede durch verschiedenartige Alpha-Helices offengelegt.<sup>20</sup> Die dimere Struktur von Glycodelin A veränderte sich im sauren (pH 2,0), nicht aber im alkalischen Bereich. Die sialysierten Säurereste in der Oligosaccharidstruktur scheinen für diese Unterschiede verantwortlich zu sein.<sup>21</sup> Unsere Arbeitsgruppe entwickelte erstmals drei IgG-1-monoklonale Antikörper, die bei der immunhistochemischen Darstellung von Glycodelin A von großer Bedeutung sind.<sup>22,23</sup>

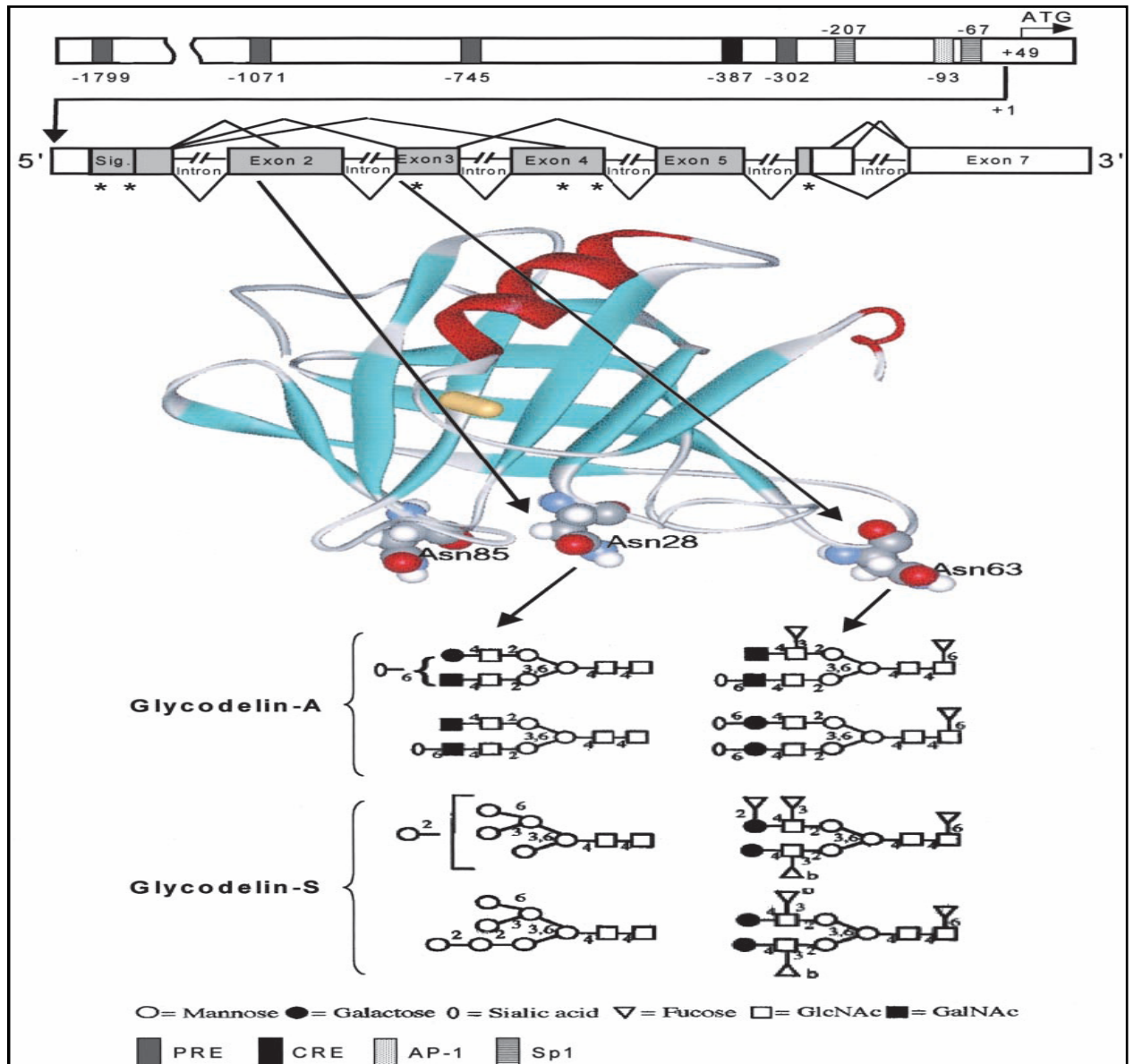


Abb. 2: Struktur des Glycodelin-Moleküls. Die Promotor-Region des Glycodelin A-Gens ist im oberen Teil dargestellt. Die erste Base auf dem Exon 1 ist der Start. ATG ist das die Translation einleitende Codon. Es zeigen sich hohe Anteile von CRE (cAMP-responsive elements), AP-1 (activator protein-1 elements), PRE und Sp1.<sup>12</sup>

	5	15	25	35	45	55
Gd	QTKQDLELPK	LAGTWHSMAM	ATNNISLMAT	LKAPLRVHIT	SLPTPEDNL	EIVLHRWENN
BLG	QTMKGLDIQK	VAGTWYSLAM	AASDISLLDA	QSAPLRVYVE	ELKPTPEGDL	EILLQKWENG
Gd	65	75	85	95	105	115
Gd	SCVEKKVLGE	KTENPKKFKI	NYTVANEATL	LDTDYDNFLF	ICLQDTTTP	QSMCCOYLAR
BLG	ECAQKKIIAE	KTKIPAVFKI	DALNENKVLV	LDTDYKKYLL	FCMENSAEPE	QSLVCQCLVR
Gd	125	135	145	155		
Gd	VLVEDDEIMQ	GFIRAFRPLP	RHLWYLLDLK	QMEEP		
BLG	TPEVDDEALE	KFDKALKALP	MHIRLSFNPT	QLEEQ		

Abb. 3: Vergleich der Gensequenzen von Glycodelin A und beta-Laktoglobulin im Bereich der Aminosäuren 5 bis 159. Identische Bereiche sind schattiert dargestellt und entsprechen 43% des Abschnitts.<sup>19</sup>

### 1.3 Glycodelin A-Isoformen

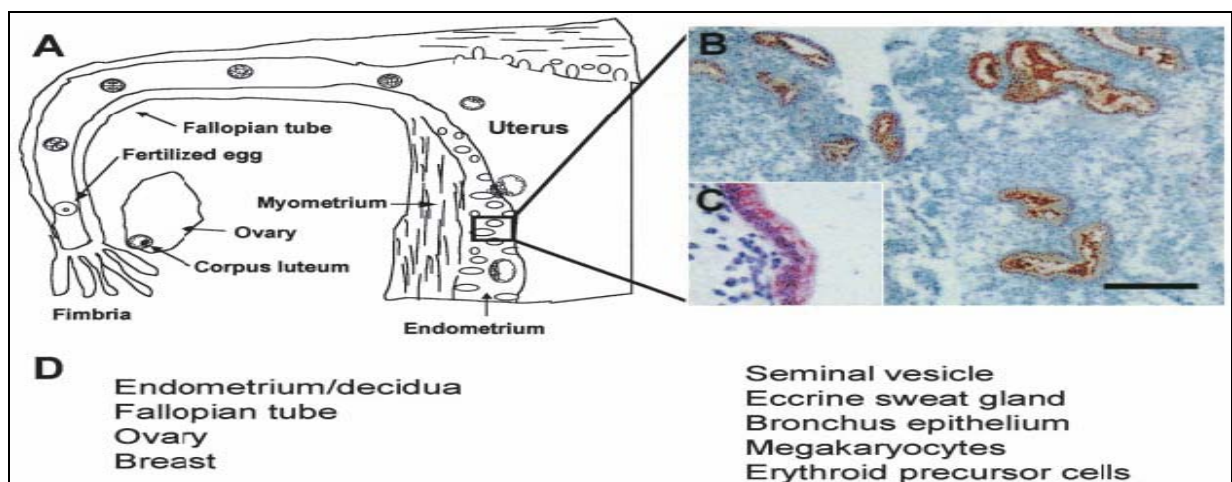
Folgende Isoformen wurden beschrieben: Glycodelin A aus menschlicher Amnionflüssigkeit, Glycodelin S aus dem Seminalplasma bzw. den Seminalvesikeln des Mannes und Glycodelin F aus der Follikelflüssigkeit.<sup>24</sup> Die drei Isoformen besitzen identische Protein-Grundgerüste, aber unterschiedliche Glykosylierungen. Die Tabelle vergleicht die Glycoproteine Glycodelin A und Glycodelin S (Tab.3). Bei der Unterscheidung der Isoformen gingen Koistinen et al. speziell auf die unterschiedlichen N-Glycane bzw. die Rolle der Glycosylierung im Molekül von Glycodelin A und Glycodelin S ein. Vergleichsstudien liegen für Glycodelin F nur teilweise vor.<sup>25</sup> Zusätzlich zur Lektinbindungsaffinität zeigt Glycodelin A aus dem Endometrium, aus der Dezidua und aus der Amnionflüssigkeit identische isoelektrische Punkte und hat inhibierende Effekte auf die Sperma-Eizell-Bindung.<sup>26,27</sup> Im Gegensatz zu Glycodelin A hemmt Glycodelin S nicht die Sperma-Eizell-Bindung.<sup>28</sup> Mögliche kontrazeptive Funktionen des Glycodelin A wurden für Glycodelin S nicht nachgewiesen.<sup>29</sup>

	<b>Glycodelin A</b>	<b>Glycodelin S</b>
Ursprung	Amnionflüssigkeit	Seminalplasma
Molekulargewicht	28 kDA	27,3 kDA
Isoelektrischer Punkt	4,5-5,2°C	4,9-5,6°C
Kryptische Peptide	identisch mit GdS	identisch mit GdA
N-terminale Sequenz	identisch mit GdS	identisch mit GdA
Reaktion mit Antikörpern	identisch mit GdS	identisch mit GdA
cDNA-Sequenz	identisch mit GdS	identisch mit GdA
Hauptkomplexartige N-Glykane	LacNAc, LacdiNac, sialylierte LacNAc, Lewis <sup>x</sup>	Lewis <sup>x</sup> , Lewis <sup>y</sup> , fruktosereich
Denaturierungstemperatur	66°C	66°C
Ligandenbindung	keine	keine

**Tab. 3:** Struktureller Vergleich der Glycodelin-Isoformen A und S

## 1.4 Glycodelin A Expressions-Areale

Im Tierversuch fanden sich Glycodelin A-Expressionen in allen Arealen weiblicher und männlicher Genitaltrakte.<sup>30</sup> Foth et al. untersuchten die Serumspiegel von Glycodelin A und IGFBP-1 bei prämenopausalen Frauen, die sich einer Hysterektomie bzw. einer bilateralen Oophorektomie unterziehen lassen mussten.<sup>31</sup> Der Glycodelin A-Spiegel sank nach der Entfernung von Uterus und Ovar bis zum 3. postoperativen Tag ab, um dann wieder deutlich anzusteigen. Der perioperative IGFBP-1-Spiegel zeigte sich hingegen unverändert. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die entnommenen Organe primär für die Produktion von Glycodelin A verantwortlich sind, dass aber auch andere Organe an der Expression von Glycodelin A beteiligt sein müssen. Nach derzeitigem Kenntnisstand kann für folgende Gewebe eine Glycodelin A-Expression als gesichert gelten: Endometrium, Ovar (speziell in Theka- sowie Granulosazellen), Tube, Knochenmark, Parabronchialdrüsen, Nabelschnurvene, Schweißdrüsen, in milchproduzierenden, duktalem, tubulärem, lobulärem und gemischt duktalem-tubulärem Epithelzellen sowie Seminalplasma, Samenblase und Ampulle des Vas deferens des Mannes. Außerdem wurde das Glykoprotein in entartetem Gewebe festgestellt: endometriale Adenokarzinome, neoplastischer Zervix, Zervixkarzinome, Ovarialzysten, Ovarialkarzinome und Borderlinetumoren, Synovialsarkome, milchproduzierende, duktales, tubuläres, lobuläres und gemischt duktales-tubuläres Adenome. Die Expression findet im Drüsen- und Oberflächenepithel statt. Sie erfolgt vorwiegend in Gewebe mit Steroidrezeptoren (Abb. 4).<sup>1,30,32,33</sup>



**Abb. 4:** Glycodelin-synthetisierendes Gewebe. (A) Ovar, Tube und Endometrium; (B) Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im sekretorischen Endometrium; (C) in situ Hybridization von Glycodelin A-mRNA im sekretorischen Endometrium; (D) Gewebe und Zellen, in denen vom Autor Glycodelin A nachgewiesen wurde.<sup>31</sup>

### 1.4.1 Endometrium

Das Endometrium und die Dezidua stellen Hauptexpressionsareale des Glycodelin A dar.<sup>8,34</sup> Speziell im Stroma des Endometriums konnten Glycodelin A-Expressionen nachgewiesen werden.<sup>4</sup> Die Möglichkeit, dass Glycodelin A als Marker für den Funktionszustand des sekretorischen Endometriums dienen könnte, wurde diskutiert. Dabei untersuchten verschiedene Autoren Glycodelin A-Spiegel in Abhängigkeit von Progesteron- und Östrogen-Spiegeln, ohne jedoch genauere Erkenntnisse gewinnen zu können.<sup>35</sup> Spitzenwerte werden in der sekretorischen Phase, geringere Werte in der späten proliferativen Phase festgestellt (Tab.4).<sup>36</sup> Große signifikante Unterschiede von Glycodelin A-Spiegeln im Endometrium konnten in Studien festgestellt werden, bei denen nichtschwangere Frauen und Frauen im ersten Trimester verglichen wurden.<sup>26</sup> Bei schwangeren Frauen wurden Spitzenwerte im Fruchtwasser zwischen der 12. und der 20. Woche gemessen. Im Serum schwangerer Frauen lagen Höchstwerte zwischen der 6. und der 12. Woche vor. Bei Frauen mit Tubaraborten und Spontanaborten in der Frühschwangerschaft wurden im Vergleich zu gesunden schwangeren Frauen signifikant niedrigere Werte erhoben.<sup>37</sup> Weitere Bestimmungsorte waren Plasma und Uterusspülflüssigkeit bei Patientinnen mit Endometrium-Adenokarzinomen.<sup>38,39</sup>

Unsere Arbeitsgruppe fand heraus, dass nach Glycodelin A-Stimulation Trophoblastenzellkulturen weniger human placental lactogen (hPL) sowie Thomsen-Friedenreich-Antigen (TFA) produzierten.<sup>40,41</sup> An der maternofetalen Grenzfläche ist Glycodelin A an funktionellen und parakrinen Vorgängen der Trophoblastzellen sowie deren Differenzierung beteiligt. Glycodelin A wirkt im Endometrium als zelluläres Strukturprotein, welches Differenzierungsprozesse, wie Epitheldifferenzierung und glanduläre Morphogenese, induziert.<sup>42</sup>

Endometrium-Histologie	Glycodelin A-Konzentration
Proliferative Phase	0,150 µg/g Protein
Sekretorische Phase	7,75 µg/g Protein
Dezidua in der Frühschwangerschaft	650,0 µg/g Protein
Dezidua in der Spätschwangerschaft	19,0 µg/g Protein

**Tab. 4:** Mittlere Glycodelin A-Konzentrationen im endometrialen Gewebe in Bezug auf die Phase der Differenzierung<sup>36</sup>

### 1.4.2 Ovar

Der Einfluss des Ovars auf die Glycodelin A-Bildung, speziell in der frühen Schwangerschaft, wurde diskutiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass das maternale Ovar in der frühen Schwangerschaft Glycodelin A produziert, und verschiedene Effekte auf das deziduale Endometrium ausübt. Nicht geklärt werden konnte, ob das ovariell gebildete Glycodelin A oder das ebenfalls nachgewiesene endometrial gebildete Glycodelin A hauptverantwortlich für diese Effekte ist.<sup>43</sup> Ovariell gebildetes Glycodelin A wurde immunhistochemisch im Stroma von Rinde und Mark, in der Theka interna und in der Granulosa nachgewiesen. Ein positiver Expressionsnachweis konnte für seröse Zystadenome und seröse Zystadenokarzinome, nicht aber für muzinöse Zystadenome gestellt werden.<sup>1</sup>

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte Glycodelin A-Expressionen in Ovarialzystenflüssigkeiten, im Gewebe von Borderline-Tumoren, im Gewebe von Ovarialkarzinomen sowie im Serum von Patientinnen mit benignen und malignen Ovarialtumoren. Es zeigten sich signifikant höhere Werte für die malignen Proben. In zystischen Flüssigkeiten von gutartigen und Borderline-Ovarialtumoren wurden im Gegensatz zum Gewebe benigner Ovarialtumoren erhöhte Glycodelin A-Konzentrationen nachgewiesen.<sup>44,45</sup> In einer weiteren Studie wurde Glycodelin A mittels RT-PCR in den Granulosazellen, nicht aber in Cumuluszellen nachgewiesen, immunhistochemisch jedoch in beiden Arealen. Es scheint ein Transport stattzufinden. Dieser könnte zum einen über Gap Junctions, zum anderen über die Follikelflüssigkeit stattfinden.<sup>46</sup> Genauer untersuchte eine weitere Studie die Expressionsareale innerhalb des Ovars bei serösen Zystadenomen. Lokalisiert wurde das Glykoprotein im Zytoplasma der Tumorzellen, nicht aber im vaskulären Endothel des Tumorgewebes. In den Granulosazellen des Ovars erfolgt die Glycodelin A-Expression insbesondere in der fertilen Lebensphase.<sup>46</sup> Im Flimmerepithel, speziell in den Fimbrien, in der proximalen Ampulle, in der distalen Ampulle, sowie im sekretorischen Epithel der Mucosa der Eileiter findet ebenfalls eine Expression von Glycodelin A statt. Die höchste Konzentration wurde in den Fimbrien gemessen. Niedriger lagen die Werte in der proximalen und distalen Ampulle. Entsprechend dem Endometrium sind auch hier Höchstwerte in der sekretorischen Phase feststellbar.<sup>47</sup> Erniedrigte Werte sowohl von Glycodelin A als auch von IGFBP-1 wurden bei Patientinnen mit dem Polyzystischen Ovar Syndrom (PCOS) im ersten Trimester der Schwangerschaft festgestellt.

Endometriale, epitheliale oder stromale Dysfunktionen, möglicherweise durch erniedrigte Glycodelin A-Spiegel ausgelöst, könnten für den Zusammenhang von hohen Fehlgeburtenraten beim PCOS sprechen.<sup>48</sup>

### **1.4.3 Mamma**

Mittels PCR wurde Glycodelin A in MCF-7-Brustkrebszellen, speziell im Zytoplasma, sowie in milchproduzierenden, duktafen, tubulären, lobulären und gemischt duktaf-tubulären Epithelzellen nachgewiesen. Glycodelin A scheint an der Bildung von organisierten azinären Verbänden beteiligt zu sein.<sup>32,49</sup> Neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten erhöhte Glycodelin A-Expressionen bei invasiv wachsenden Mammakarzinomen ohne Metastasen im Vergleich zu schwachen Expressionen bei metastasierenden Mammakarzinomen.<sup>50</sup> Bislang konnten keine Aussagen getroffen werden, ob der Glycodelin A-Spiegel hinweisend auf den Krankheitsverlauf bzw. auf die Überlebensrate sein könnte.<sup>51</sup>

### **1.4.4 Hoden**

Mehrere Gruppen stellten eine Glycodelin S-Expression ebenfalls im Seminalplasma, in der Samenblase und der Ampulle des Vas deferens des Hodens fest. Die Glycodelin S-Werte im Plasma bei vasktomierten und nicht-vasktomierten Männern sind gleich.<sup>27</sup> Das Seminalplasma scheint einen protektiven Effekt auf das Glycodelin S-Molekül auszuüben.<sup>29</sup> Neueste Studien zeigen, dass Glycodelin S im menschlichen Seminalplasma den Cholesterolefflux reduziert und die Kapazitation der Spermatozoen hemmt. Das widerspricht bisherigen Studien, die davon ausgingen, dass Glycodelin S keine kontrazeptiven Funktionen besitzt.<sup>52</sup>

### 1.4.5 Tumorerkrankungen

Kämäräinen et al. wiesen das Glycoprotein in Ovarialtumoren, Synovialsarkomen sowie in milchproduzierenden, duktalem, tubulären, lobulären und gemischt duktalem-tubulären Adenomen nach.<sup>1,49</sup> Starke Glycodelin A-mRNA und Protein-Expressionen wurden in Tumorgewebe von Endometrium-, Ovarial- und Zervixkarzinomen festgestellt.<sup>53</sup> Bei Brust-, Zervix-, Endometrium-, Ovarialkarzinom- und Leukämiezellen kam es nach dosisabhängiger Stimulation mit Lysophospholipiden zu einer Steigerung der Glycodelin A-Expression. Diese Stimulation konnte durch Mifepristone gehemmt werden.<sup>54</sup> Connor et al. wiesen das Glycoprotein ein weiteres Mal im Bereich des Zervixkarzinoms nach.<sup>55</sup> Song et al. untersuchten Glycodelin A mit Hilfe von Tumorzelllinien und fanden Hinweise darauf, dass das Glycoprotein eine Rolle bei der Neovaskularisierung während der Embryogenese und bei der Tumorentwicklung spielen könnte.<sup>56</sup>

### 1.4.6 Schwangerschaft

Hohe Glycodelin A-Expressionswerte werden bei schwangeren Frauen im Fruchtwasser zwischen der 12. und der 20. Woche gemessen. Im Serum sind Spitzenwerte zwischen der sechsten und zwölften Woche messbar. Ab der 20. Woche sinken die Messwerte dann erheblich und erreichen ein gleich bleibend niedriges Niveau um die 24. Schwangerschaftswoche. Es wurde festgestellt, dass Frauen mit einer normal verlaufenden Frühschwangerschaft höhere Glycodelin A-Spiegel aufwiesen als Frauen mit Tubaraborten und Spontanaborten in der Frühschwangerschaft.<sup>37</sup> Ebenso zeigten sich bei schwangeren Frauen mit einer intrauterinen Wachstumsverzögerung (IUGR) sowie beim HELLP-Syndrom erniedrigte Glycodelin A-Werte.<sup>57</sup> Skornicka et al. gingen auf die nicht kovalente und spezifische Bindung des Pregnancy Zone Proteins (PZP) an Glycodelin A ein.<sup>58</sup> Beide Proteine zeigen simultane Anstiege während der Schwangerschaft und hemmen die T-Zell-Aktivierung sowie die IL-2-Produktion synergistisch. Insgesamt wird vermutet, dass Glycodelin A eine protektive Rolle beim Schutz der Schwangerschaft hat.



## 1.5 Glycodelin A-Funktionen

### 1.5.1 Immunsuppression

Glycodeline sind in der Lage, folgende Funktionen zu übernehmen: Bindung hydrophober Moleküle, Bindung an Zelloberflächen-Rezeptoren sowie Bildung von Komplexen mit löslichen Makromolekülen.<sup>59</sup> Glycodelin A besitzt eine umschriebene Rolle bei der Immunmodulation und Immunsuppression (Tab.5). Es unterdrückt Immunreaktionen an der fetomaternalen Grenzfläche. Glycodelin A hemmt die T-Zell-Aktivierung und –Proliferation durch Apoptosevorgänge auf aktivierte T-Zellen.<sup>60</sup> Für diese Apoptosevorgänge sind die sialysierten Glycane im Glycodelin A verantwortlich.<sup>59</sup> Ish-Shalom et al. zeigten, dass Glycodelin als direkter T-Zell-Inhibitor wirksam ist.<sup>61</sup> Nach Senkung der Glycodelin A-Konzentration im Fruchtwasser durch Immunpräzipitation stieg die Anzahl der T-Zellen deutlich an.<sup>62</sup> Glycodelin A zeigt seine immunsuppressiven Fähigkeiten durch Induktion der Apoptose in aktivierten T-Zellen. Die für diese Funktion entscheidenden Glycane liegen beim Glycodelin S, das nicht immunmodulatorisch wirksam ist, in maskierter Form vor. Damit ist die Form der Glycodylierung für die Apoptosefähigkeit entscheidend.<sup>63</sup> Glycodelin A besitzt eine hemmende Wirkung bei der Freisetzung von Interleukin-1, -2, -6 und Interleukin-2-Rezeptoren von stimulierten Lymphozyten.<sup>64,65</sup> Pockley et al. beschrieben den Effekt von Glycodelin A auf die Lymphozyten-Aktivität, und die dadurch veränderte Synthese von Lektinen.<sup>66</sup> Lektine spielen eine Rolle bei der Immunabwehr und bei der ribosomalen Proteinbiosynthese. Glycodelin A bindet temperatur- und pH-abhängig an monozytäre CD14-Zellen.<sup>67</sup> Glycodelin A supprimiert die zytolytische Kapazität der natürlichen Killerzellen (NK –Zellen) in vitro und stimuliert die Th2-Typ Cytokin-Produktion in Monocyten sowie IL-6 und IL-10.<sup>64, 67</sup> Yaniv et al. wiesen regulatorische Effekte von Glycodelin A auch auf die B-Zell-Reihe nach.<sup>68</sup> Über Oligosaccharidantennen kann die Bindung an den humanen B-Zell-Rezeptor erfolgen. Die Antennen sind für die Immunabwehr von entscheidender Bedeutung.<sup>69</sup> Clark et. al. identifizierten derartige Ketten bei Zellen HIV-infizierter Menschen.<sup>70</sup> Es scheint möglich, dass auf diesem Wege erklärt werden könnte, wie sich pathogene Zellen effizient vor Immunreaktionen schützen.<sup>71</sup> Modifiziertes Beta-Laktoglobulin hat einen inhibierenden Effekt auf die Bindung von HI-Viren an CD4+-Zellen.<sup>72</sup> Seppälä et al. untersuchten, welchen Einfluss ebenfalls modifiziertes Glycodelin A auf diese Bindung hat. Es zeigte sich ein verringertes Bindungsverhalten des HIV- Oberflächenproteins

gp120 an CD4+-Zellen.<sup>73</sup> Glycodelin A stimuliert im proliferativen, nicht aber im sekretorischen Endometrium die Produktion von Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha (TNF-Alpha/ Kachektin), der als Zytokin bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle spielt.<sup>74</sup>

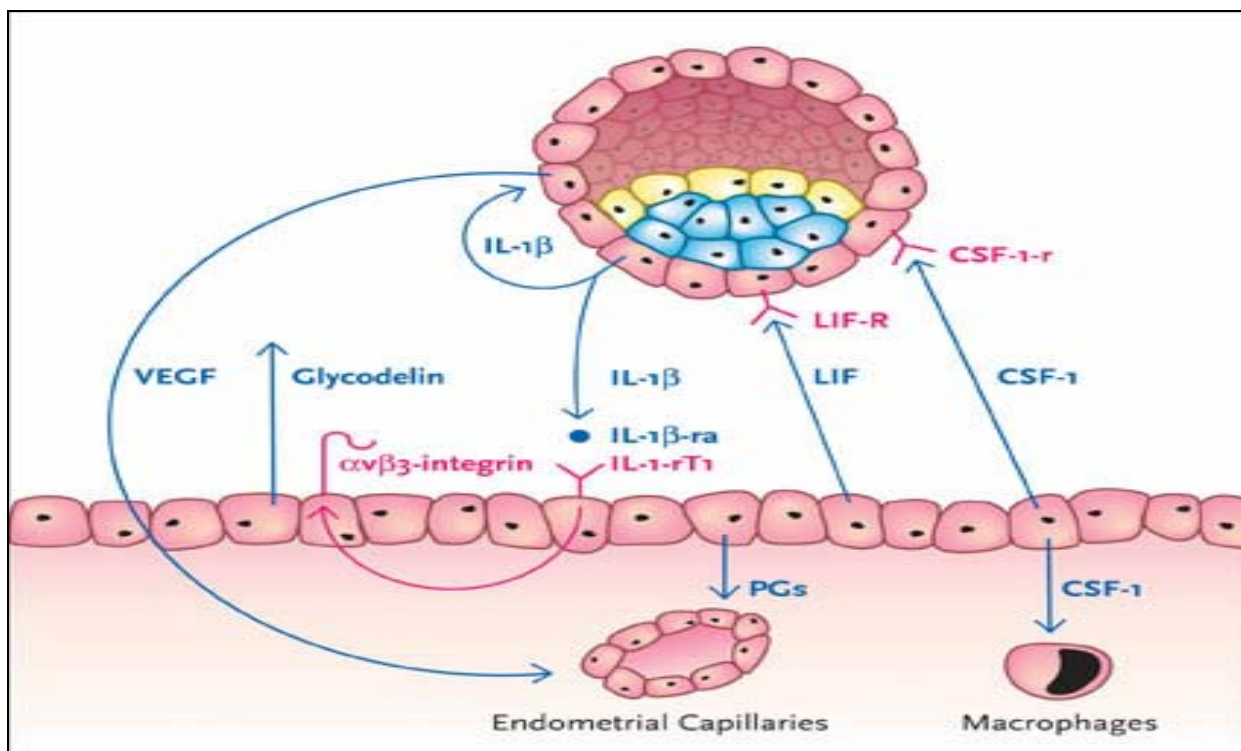
Funktion und Aktivität	Autoren
Hemmung der T-Zell-Proliferation	[60, 61, 75, 76]
Stimulation des Zytokins TNF-Alpha	[74]
Temperatur- und pH-abhängige Bindung an monozytäre CD14+ Zellen	[67]
Hemmung der Thymidin- Aufnahme in Lymphozyten	[66]
Hemmung der Synthesis von IL-1, -2, -6 und IL-2-Rezeptors	[64, 65]
Hemmung von natürlichen Killerzellen (Zytotoxizität)	[62]
Hemmung der Chemotaxis von Monozyten (U937 Zellen)	[77]
Regulatorische Effekte auf die B-Zell-Reihe	[68]
Verringerte Bindung des HIV-Oberflächenproteins an CD4-Zellen	[72, 73]

**Tab. 5:** Immunmodulation durch Glycodelin A

### 1.5.2 Reproduktion und Schwangerschaft

Die Konzentrationen von Glycodelin A im Serum steigen während der 2. Hälfte der sekretorischen Phase an und erreichen ihr Maximum während der Menstruation. Bei Eintreten einer Schwangerschaft kommt es zu einem Konzentrationsanstieg von Glycodelin A im Serum. Spitzenwerte in der Dezidua werden zwischen der sechsten und zwölften Schwangerschaftswoche gemessen. Daraus ergeben sich wichtige Funktionen beim Erhalt der Frucht. Glycodelin A ist in der gesamten fertilen Phase im Endometrium nachweisbar. Während der Ovulation konnten nur geringe Glycodelin A-Spiegel nachgewiesen werden. Höhere Konzentrationen lassen sich erst 5 Tage postovulatorisch messen.<sup>3,5,10</sup> Glycodelin A ist imstande, die Bindung des Spermatozoons an die Zona pellucida durch Bindung an das Akrosom dosisabhängig zu hemmen und nimmt damit negativen Einfluss auf die Kapazitation. Es besteht eine

strukturelle Ähnlichkeit von Glycodelin A zum Zona-binding inhibitory factor-1 (ZIF-1). Auf der Akrosomenmembran hat das Glycodelin A eine Affinität zur sogenannten „low-affinity site“.<sup>25,78,79</sup> Der Glycosylierungs-Status hat Einfluss auf die Hemmung der Sperma-Eizell-Bindung. Es werden zwei Formen des Glycodelins unterschieden. Während „nongly-Glycodelin“ die Kapazitation und das Fertilisations-Potential von Spermatozoen verbessert, wird dies von „glycosylated-Glycodelin“ gehemmt.<sup>80</sup> Im Eileiter sorgen Glycodelin A und F für den Schutz der Spermatozoen vor der mütterlichen Immunreaktion. In den Kumuluszellen scheint Glycodelin A Einfluss auf die Produktion des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und damit auf die Angiogenese und Gefäßpermeabilität zu nehmen (Abb. 5).<sup>3,52,81-85</sup> Tulppala et al. vermuteten in der Hemmung von NK-Zellen durch Glycodelin A eine Beeinflussung der mütterlichen Immunantwort gegenüber dem Feten.<sup>89</sup> Nachgewiesen wurde, dass erniedrigte Glycodelin A-Spiegel mit habituellen Aborten und ektopen Schwangerschaften korrelieren.<sup>89,90,91</sup> Auch der Progesteroneinfluss auf die Glycodelin A-Expression ist aus kontrazeptiver Sicht interessant. Progesteron enthaltende Kontrazeptiva verstärken ihre Funktion möglicherweise durch Glycodelin A bzw. durch die spezifischen Oligosaccharidketten.<sup>82</sup> Riitinen et al. stellten einen erniedrigten Glycodelin A-Spiegel bei Frauen in der Postmenopause fest, der sich jedoch durch Östrogen- bzw. Progesterongabe steigern ließ.<sup>93</sup> Levonorgestrel hemmt die Glycodelin A-Expression des Endometriums.<sup>94-96</sup> Ein weiterer Zusammenhang wurde zwischen niedrigen Glycodelin S-Werten bei geschlechtsreifen Männern und frühen Spontanaborten geschlechtsreifer Frauen festgestellt.<sup>26</sup> Die Funktion von Glycodelin A als Marker im Hinblick auf den Schwangerschaftsverlauf wurde diskutiert, jedoch nicht untermauert.



**Abb. 5:** Übersicht einiger Faktoren im "embryo-uterinen-Dialog" neben Glycodelin A: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF);  $\alpha\text{v}\beta 3$ -Integrin; Interleukin-1-alpha (IL-1-alpha); Interleukin-1- $\beta$ -Rezeptor-Antagonist (IL-1- $\beta$ -ra); Interleukin-1-Rezeptor-Type-1 (IL-1-rT1), Prostaglandine (PG), Leukaemia inhibitory factor (LIF); LIF-Rezeptor (LIF-R), und Koloniestimulierender Faktor (CSF-1).<sup>3</sup>

### 1.5.3 Endokrinologie

Untersucht wurden Regelkreise bei schwangeren und nichtschwangeren Frauen und die bestehenden ovariellen bzw. hypophysären Einflüsse von Glycodelin A in Anwesenheit von Progesteron und Östrogen. Glycodelin A gehört zu den humanen Progesteron induzierten Uterusproteinen, wie auch Integrin und Muzin-1.<sup>97-99</sup> Byrjalsen et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von Progesteron und sahen die Möglichkeit, mit Hilfe von Glycodelin A den Progesteronspiegel zu bestimmen.<sup>100</sup> Laut Mueller et al. wird die Expression von Glycodelin A nicht von Östrogen beeinflusst.<sup>101</sup> Krankheitsbedingt bzw. medikamenteninduziert erniedrigte Progesteronspiegel ziehen ebenfalls einen erniedrigten Glycodelin A-Spiegel nach sich.<sup>77</sup> Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass es durch Expression von Glycodelin A in Trophoblastenzellen zu einer Erhöhung des Progesteronspiegels kommt.<sup>102</sup> Inwieweit Progesteron Einfluss auf Vorgänge bei der Transkription des Glycodelin A-Gens nimmt, bleibt unklar.

Progesteron besitzt einen synthesessteigernden Effekt auf Relaxin. Glycodelin und Relaxin werden von luteinisierenden Granulosazellen produziert.<sup>46</sup> Entgegen früherer Studien scheint auch Relaxin die Glycodelin A-Produktion in Endometriumzellen zu steigern, wobei die vermehrte Glycodelin A-Produktion einem Relaxin-Peak folgt. Vermutet wird, dass Relaxin direkt die Expression von Glycodelin A aus den Follikelzellen stimuliert.<sup>103</sup> Neuere in vitro-Studien widersprechen dieser Annahme.<sup>101</sup> Durch Zelldifferenzierungsvorgänge kommt es zur Entwicklung des Synzytiotrophoblasten aus Zellen des Zytotrophoblasten. Dabei produzieren Trophoblastzellen hCG sowie Progesteron. Die Konzentrationen geben jeweils Aufschluss über den Grad der Fusionierung. Entsprechende Studien zeigten stimulative Einflüsse von Glycodelin A auf Zytotrophoblastzellen, was mit einem Anstieg des hCG-Spiegels verbunden war.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass Glycodelin A zeit- und dosisabhängig in vitro die Beta-hCG m-RNA-Expression von Jeg 3- Trophoblastzellen stimulierte.<sup>114-118</sup> Der gesenkte Prolaktin-Spiegel während der ovariellen Hyperstimulation wird gefolgt von einem Glycodelin A-Anstieg in der lutealen Phase.<sup>109</sup> Für eine vielfach vermutete Interaktion von Insulin und Glycodelin A konnten bisher keinerlei Anhaltspunkte gefunden werden.<sup>110</sup>

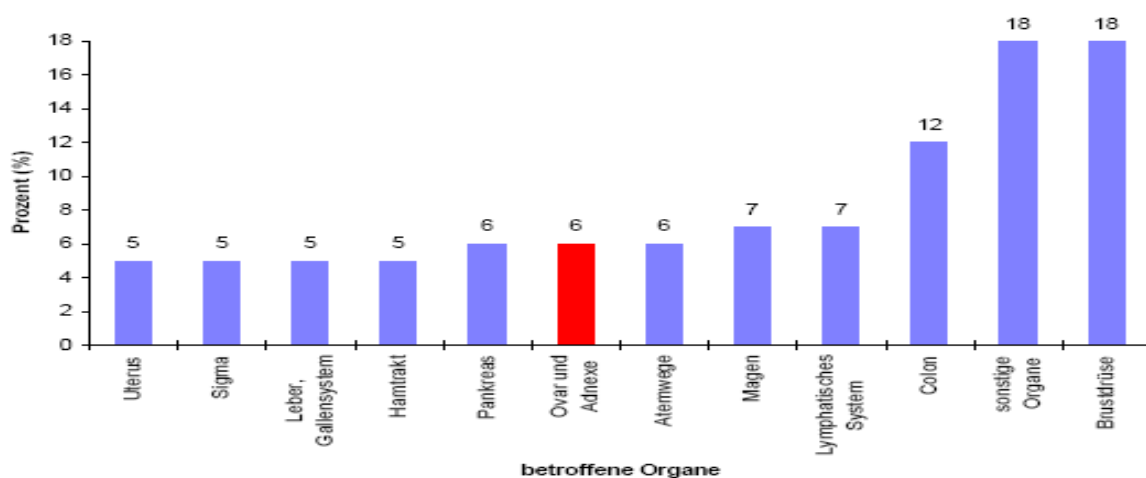
## 1.6 Glycodelin A-Antikörper-Herstellung

Die Aufreinigung des Glycodelin A erfolgte aus humanem Fruchtwasserpool des 2. Schwangerschaftstrimesters. Nach Dialyse erfolgte die Fraktionierung an DEAE-Sephrose. Die Fraktionen wurden weiter an Sephadex und Protein A zur IgG-Extraktion aufgereinigt. Die Abspaltung des humanen Choriongonadotropins (hCG) erfolgte über CNBr-Sephrose 4B nach moAnti-hCG-Ankopplung. Glycodelin A wurde an Octyl-Sephrose CI-4B und durch Chromatographie an Resource- Phc aufgereinigt. Die Glycodelin A-Identifizierung erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung eines polyklonalen Anti-Glycodelin A-Antikörpers. Auf dieser Basis konnte ein monoklonaler Glycodelin A-Antikörper hergestellt und ein Glycodelin A-Enzymimmunoassay entwickelt werden.<sup>44,45</sup> Die chromatographische Aufreinigung des Glycodelin A aus endometrialem Gewebe wurde von Pala et al. beschrieben.<sup>111</sup>

## 1.7 Ovarialkarzinom

### Epidemiologie, Inzidenz und Mortalität

Ovarialkarzinome machen 4% aller malignen Neuerkrankungen aus, und sind die sechsthäufigste Neoplasie der Frau (Abb. 6).<sup>112</sup> 28% beträgt der Anteil an allen gynäkologischen Neubildungen der Frau. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren.<sup>113</sup> In den meisten westlichen Ländern ist das Ovarialkarzinom der gynäkologische Tumor mit der höchsten Letalität. Es macht 80-90% aller Ovarialmalignome aus.<sup>114</sup> Bei circa 50% der Frauen besteht eine Mutation in den Genen BRCA1 sowie BRCA2.<sup>115</sup> Das genetische Risiko aller Frauen, an einem genetisch bedingten Ovarialkarzinom zu erkranken, beträgt 0,05%.<sup>116</sup> Noch immer werden 75% der Ovarialkarzinome in fortgeschrittenen Stadien als Zufallsbefunde entdeckt.<sup>117</sup> Frühzeitig erkannte Ovarialkarzinome haben eine günstige Prognose. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate, unabhängig vom Stadium, beträgt 35%. Das entspricht der deutlich ungünstigsten Prognose unter allen Tumoren der Frau. Die Tumorausbreitung bei Erstdiagnose, der Differenzierungsgrad in der Histologie sowie postoperativ verbliebene Tumorbestandteile bestimmen die Prognose.<sup>118</sup> Das Ovarialkarzinom kann als Erkrankung der westlichen Industrieländer wie USA, Skandinavien und England wahrgenommen werden, wo sich auch die höchsten Neuerkrankungsraten finden. Niedrige Zahlen in Italien, Spanien und Portugal sprechen für ein Nord-Süd-Gefälle. Die Neuerkrankungsrate zeigt in den letzten 15-20 Jahren keine wesentliche Veränderung, mit einer leicht abnehmenden Mortalität. In Deutschland erkranken jährlich 7400 Frauen neu.<sup>115</sup>



**Abb. 6:** Krebserkrankungen nach betroffenen Organen in Prozent<sup>119</sup>

Ätiopathogenese Hall et al. untersuchten Vorerkrankungen, die prädisponierende Faktoren darstellen, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken: Kolonkarzinom (17,9-fach), Uteruskarzinom (11,9-fach), Mammakarzinom (6-fach), Zervixkarzinom (4,2-fach) sowie malignes Melanom (3,5-fach).<sup>120</sup> Verschiedene risikosteigernde Faktoren sind beschrieben worden (Tab. 6). Das relative Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, sinkt bei Patientinnen mit einer überdurchschnittlichen Schwangerschaftshäufigkeit, einer frühen ersten Schwangerschaft und einer lang andauernden Einnahme von Kontrazeptiva.<sup>121,122</sup> Das Tumorstadium (FIGO), das Alter, Aszitesbildung, der Aktivitätsindex, die Tumorgroße, das Grading und die histologische Differenzierung gelten als gesicherte unabhängige Prognosefaktoren beim Ovarialkarzinom. Unklar hingegen sind derzeit noch Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus sowie postoperativer CA 125 Verlauf. Im Falle eines Rezidivs sind ein schlechter Allgemeinzustand (in Kombination mit dem Alter: „Karnofsky-Index“), eine muzinöse Differenzierung, eine große Anzahl von Rezidivherden und ein kurzes krankheitsfreies Intervall hinweisend auf einen ungünstigen Krankheitsverlauf.<sup>123</sup>

Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms	Geschätztes relatives Risiko
Ovarialkarzinom in der Verwandtschaft	3-4
Höheres Lebensalter	3
Wohnort in Nordamerika oder Nordeuropa	2-5
Sterilitätsanamnese	2-5
Perineale Talkum-Puder-Anwendung	1,5-2
Höheres Bildungsniveau und Einkommen	1,5-2
Späte Menarche	1,5-2
Frühe Menarche	1,5
Weißer Rasse	1,5
Status nach Hysterektomie	0,5-0,7
Verwendung oraler Kontrazeptiva	0,3-0,5

Tab. 6: Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms<sup>113</sup>

### Histologie, Stadieneinteilung und Klassifikation

Es handelt sich um maligne Proliferationen des Oberflächenepithels der Eierstöcke und des darunter liegenden Stromas. Laut WHO werden die primären Ovarialkarzinome in 5 Gruppen eingeteilt: Die malignen epithelialen Tumore (80-90%), die malignen Keimstrang-Stroma-Tumore (<3%), die Steroidzell-Tumore (1-2%), die malignen Keimzell-Tumore (1-2%) und die Gonadoblastome (1-2%). Für das maligne epitheliale Karzinom sind die folgenden histomorphologischen Subgruppen beschrieben worden: seröses Karzinom (40-50%), muzinöses Karzinom (10-15%), endometrioides Karzinom (10-15%) und das hellzellige Karzinom (2-6%). Das seröse Karzinom wird überwiegend in den FIGO-Stadien III-IV, die übrigen Subtypen in den Stadien I-II diagnostiziert. Weitere Untergruppen stellen Plattenepithelkarzinome des Ovars (1%), Brenner Tumoren (1%), gemischte Formen (1%), undifferenzierte (5-10%) und unklassifizierbare Karzinome (2-3%) dar. Die serösen Karzinome fallen durch papilläre Strukturen auf und breiten sich früh, prognostisch ungünstig, extra-ovariell aus.<sup>124</sup> Histologisch fallen die serösen Karzinome durch Psammomkörperchen auf, die als rundbegrenzte Kalzifikationen imponieren. Die muzinös-epithelialen Karzinome haben eine bessere Prognose, da sie in mehr als 60% in den FIGO-Stadien I und II festgestellt werden.<sup>125</sup> Sie sind durch ein zystisches Wachstumsmuster charakterisiert. Die endometrioiden Karzinome wachsen oft solide oder tubulär und zeigen sich, wie auch die muzinösen Karzinome, als größtenteils hochdifferenziert. Die niedrig differenzierten hellzelligen oder klarzelligen Karzinome fallen durch große unregelmäßige Zellkerne in einem hellen Zytoplasma auf und sind prognostisch eher ungünstig einzustufen.<sup>124</sup> Der Punkte-Score nach Silverberg erlaubt Aussagen über das histopathologische Grading.<sup>126</sup> Die Stadieneinteilung basiert auf den aktuellen Fassungen der FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique 1985) und der TNM-Klassifikation der UICC (International Union against Cancer 1997).<sup>127</sup>

### Klinik

Häufig wird die Diagnose Ovarialkarzinom spät gestellt. Fremdkörpergefühl, gastrointestinale Beschwerden, Blutungsstörungen, Schmerzsymptome sowie Zunahme des Bauchumfangs sind erste klinische Hinweise. Weiterhin sind unklare Palpationsbefunde, Resistenzen im Bereich der Adnexe, positiver Lymphknotenstatus und auch Stieldrehungserscheinungen im Sinne eines akuten Abdomens richtungsweisend. Häufig wird bei peritonealer Karzinose auch ein Aszites beobachtet.<sup>128</sup>



Die anatomische Lage des Tumors, beispielsweise vor dem Uterus oder im Douglas'schen Raum, kann Blasenbeschwerden und Defäkations- bzw. Kreuzschmerzen auslösen. Der peritoneale Lymphabfluss aus der Bauchhöhle in die Pleura ist der häufigste Metastasierungsweg. Diagnostische Verfahren sind Anamneseerhebung, Ganzkörperstatus, Laboruntersuchungen, transvaginale Sonographie, Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Positronenemissionstomographie, und Farbdopplersonographie sowie die histopathologische Beurteilung.<sup>129-131</sup> Thrombozytose, Polyglobulie, autoimmunhämolytische Anämien sowie Hyperkoagulabilität können paraneoplastisch bewertet werden.<sup>132</sup>

### Therapie

Therapeutisch angewandte Maßnahmen sind die chirurgische Tumorreduktion, die Chemotherapie, die Strahlentherapie und die endokrine Behandlung. Eine Kombination ist ebenfalls möglich. Der postoperativ verbliebene Tumorrest ist für Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom der entscheidende Prognosefaktor. Dies sollte über Ausmaß und Qualität des operativen Eingriffs entscheiden. Das Ziel ist die vollständige Entfernung des Primärtumors, wobei perioperativ die Morbidität bzw. Mortalität, der Allgemeinzustand und das biologische Alter der Patientin beachtet werden müssen. Die Primäroperation sollte als „Staging-Laparotomie“ vorgenommen werden. Unter der Operation wird jede sichtbare Veränderung mittels Biopsie gesichert. Die beidseitige Adnexektomie und Hysterektomie gelten als obligat. Pelvine und paraaortale Lymphonodektomie, Omentektomie und Resektion des Beckenperitoneums sind mögliche Strategien. Komplettierungsoperation, „sekundäres Debulking“, Rezidivoperation sowie die Palliativoperation kommen weiterhin in Frage. Selten finden organerhaltende Operationen statt.<sup>133,134</sup> Die platinhaltige Chemotherapie wird kurativ, adjuvant, neoadjuvant und palliativ angewandt.<sup>135</sup> Weitere Optionen sind die zytostatische Therapie mit Paclitaxel/ Carboplatin sowie die perkutane Strahlentherapie bzw. intraperitoneale Radiokolloidtherapie.<sup>119</sup>

### Tumormarker

CA 125 stellt einen unerlässlichen Parameter bei Therapie und Verlaufskontrolle sowie einen Prognosefaktor des Ovarialkarzinoms dar. Bei gesichertem Ovarialkarzinom korrelieren Anstieg oder Abfall mit Progression oder Regression (Referenzbereiches 33-

65 U/ml).<sup>136</sup> Ein obligater Nachweis von residualen Tumorbestandteilen des Ovarialkarzinoms im freien Intervall, bzw. von Rezidiven in den folgenden 35 Monaten kann erbracht werden.<sup>137</sup> Neben CA 72/4 und CA 19-9, bedeutsam als Zweitmarker und hinweisend auf ein muzinöses Ovarialkarzinom, ist CA 15-3 erwähnenswert. In Kombination mit CA 125 wurde eine Sensitivität von 83,8% erreicht.<sup>138</sup> Rosen et al. untersuchten weitere Tumormarker (HK10, OPN, DF3, MUC1, VEGF, MES, HE4, HK 6 und CA 19-9) in ihrer komplementären Aussagekraft zum CA 125.<sup>139</sup> Auch das Cancer Associated Serum Antigen (CASA) schien in Kombination mit CA 125 hohe Sensitivität zu besitzen. Glycodelin A wurde als potentieller Tumormarker des Ovarialkarzinoms thematisiert und untersucht.

## 1.8 Vorarbeiten, Fragestellung und Zielsetzung

In früheren Untersuchungen wurden mehrere Schwangerschaftsproteine auf ihren diagnostischen Wert bei Erkrankungen in der Schwangerschaft und bei Tumoren untersucht: Alpha 1-Fetoprotein, Pregnancy Zone Protein, Schwangerschaftsprotein 1, Plazentaprotein 5, Plazentaprotein 10 und Plazentaprotein 12. Hierbei standen Fragen zur Eignung als Tumormarker im Vordergrund. Das zunächst als PP14 bezeichnete Glycodelin A erwies sich als Dezidua-Glycoprotein, dem bei der Toleranz des fetalen Allotransplantats als maternaler protektiver Faktor eine besondere Bedeutung zukommt.<sup>57,140</sup>

Weitere Erfahrungen machte unsere Forschungsgruppe an der Universitätsfrauenklinik Rostock mit primären Trophoblastenzellkulturen, der primären Endometriumzellkultur und den Chorionkarzinomzelllinien BeWo und Jeg3. Parakrine Funktionen waren Untersuchungsschwerpunkte. Glycodelin A wurde zur Stimulation des Choriongonadotropins in Trophoblastenzellkulturen eingesetzt.<sup>40,102,104-106,108</sup>

Nun galt es den Nachweis des Dezidua-Proteins Glycodelin A beim Ovarialkarzinom zu erbringen. Die Gewebeentnahmen wurden intraoperativ aus Primärtumoren und Absiedlungsproben gewonnen. Es sollte unter anderem die Frage beantwortet werden, inwiefern die Glycodelin A-Synthese des Primärtumors bei Metastasierungsprozessen aufrechterhalten wird. Vorliegend handelt es sich um erste orientierende Untersuchungen von Glycodelin A in Primärtumoren und Metastasen. Diese

Untersuchungen stellen in der Literatur eine Erstbeschreibung dar. Insbesondere war es auch das Anliegen, den immunhistochemischen Untersuchungen molekularbiologische Nachweisverfahren hinzuzufügen, um die Glycodelin A-Synthese im Tumor und zusätzlich in der Absiedlungsprobe zu untermauern. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden (Immunhistochemie und Polymerase-Kettenreaktion) sind zur Verifizierung des Glycodelin A im Gewebe beim Ovarialkarzinom und in metastasiertem Gewebe standardisierte Verfahren zum Nachweis von Proteinen in bestimmten Zelleinheiten.

---

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

#### **2.1.1 Gewebeproben**

An der Universitätsfrauenklinik Rostock und im Südstadtklinikum Rostock wurden zwischen Mai 2001 und Juni 2005 Gewebeproben von 39 Frauen entnommen. Die Probandinnen waren zu jedem Zeitpunkt mit der Verwendung der gewonnen Proben einverstanden. Die Entnahmen fanden im Rahmen klinischer Operationen statt. Die Frauen waren zum Zeitpunkt der Operation zwischen 41 und 83 Jahre alt. Der Operateur entnahm und beschriftete Proben aus unterschiedlichen anatomischen Arealen. In diesem Zusammenhang erhielten wir patientenspezifische Proben, die in Anbetracht der unterschiedlichen operativen Methoden und Operationsverfahren einer Einheitlichkeit von Patient zu Patient entbehrten (Tab.7). Die Tabelle gibt einen Überblick über die Altersverteilung der Patientinnen in den jeweiligen Diagnosegruppen (Tab. 8). Jede Gewebeprobe wurde zu drei gleichen Teilen makroskopisch zerlegt, auf die Gruppen A, B, und C verteilt, deklariert und bei  $-180^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Proben der Gruppe A führten wir der immunhistochemischen Aufarbeitung zu. Die Proben der Gruppe B wurden lysiert und so für die Untersuchung zur Genexpression bereitgestellt. Zu späteren Forschungszwecken archivierten wir die Proben der Gruppe C. Um eine Einteilung der Patienten nach Diagnosen zu erreichen, wurden vier Gruppen gebildet. Im Folgenden wird zwischen den Begriffen Primärtumor und Absiedlungsprobe unterschieden, wobei Primärtumor das jeweilige Hauptexzisionspräparat bezeichnet, unabhängig von der eigentlichen histopathologischen Dignität (Karzinom, Adenom bzw. Myomatose/Endometriose). Aus den ebenfalls operativ entnommenen Gewebeproben wurde nach immunhistochemischer und molekularbiologischer Begutachtung eine weitere Probe ausgewählt, die in dieser Arbeit - ebenfalls unabhängig von der eigentlichen histopathologischen Dignität - als Absiedlungsprobe bezeichnet wird. In Gruppe 1 fassten wir zehn Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom zusammen. Darunter befanden sich papillär-seröse, mucinöse, endometrioide, hellzellige und gemisch klarzellig-endometrioide Befunde. Gruppe 2 schließt acht Zystadenome ein. Hierbei handelte es sich um papillär-seröse, mucinöse und endometrioide Befunde. In Gruppe 3

sind neun Karzinome gelistet, die Organe außer dem Ovar betreffen: Korpuskarzinom, Zervixkarzinom, Teratom, Krukenbergtumor, Harnblasenkarzinom und Leiomyosarkom. Die Gruppe 4 enthält Gewebeproben von Patientinnen mit Uterus myomatosus und Endometriose. Die Diagnosen wurden verschlüsselt. Bei den einzelnen Gewebeproben handelte es sich um Ovar, Tube, Myometrium, Endometrium, Peritoneum, Omentum, pelvine Lymphknoten.<sup>141</sup>

Gewebe	Probenanzahl
Adnexe	51
Uterus	34
Peritoneum	17
Netz	14
Scheide	1
Appendix	3
Lymphknoten	5
Dünndarm	1
Bauchdecke	1
Zystenmaterial	1
Douglas PE	2
Blasendach	3

Tab. 7: Anzahl der Biopsien

Altersverteilung von Patientinnen mit entsprechenden Diagnosen	Durchschnittsalter in Jahren
insgesamt	59,4
maligne Ovarialkarzinome	65,9
benigne Ovarialtumoren	65,5
andere Tumoren	57,4
Uterus myomatosus/ Endometriose	56,5

Tab. 8: Altersverteilung von Patientinnen mit entsprechenden Diagnosen

### **2.1.2 Serum**

Zur Bestimmung der Glycodelin A-Konzentration im Serum entnehmen wir 16 Frauen präoperativ Blut. Das Blut wurde für die Serumgewinnung 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Proben bei -80°C im Gefrierschrank.

## **2.2 Methoden**

Die in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden stellen standardisierte Verfahren zum Nachweis von Proteinen dar. Immunhistochemie und Polymerase-Kettenreaktion umschreiben in dieser Arbeit die notwendigen Verfahren zur Verifizierung von Glycodelin A im Gewebe beim Ovarialkarzinom und in Absiedlungsproben. Mit Hilfe von Antikörpern kann in der Immunhistochemie bestimmt werden, in welchem Gewebe das Protein vorhanden ist und auch, in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert ist. Außerdem dient die Immunhistochemie der Identifikation und Klassifizierung von Tumorzellen, die bestimmte Antigene exprimieren. Tumoren, die sich in verschiedenen Parametern unterscheiden (Wachstums- und Absiedlungsverhalten, Therapieantwort), können trotz gleicher Morphologie unterschieden werden. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich Erbsubstanzen in vitro zu vervielfältigen, die mit Hilfe von Primern eine bestimmte gesuchte Gensequenz vorgeben, um im weiteren Verlauf Aussagen über das Expressionsausmaß tätigen zu können.

### **2.2.1 Immunhistochemische Aufarbeitung**

#### **2.2.1.1 Anfertigung der Gefrierschnitte**

Ich untersuchte Gewebeproben von 39 Frauen. Die Exzidate stammten aus 17 verschiedenen Arealen. Nicht verwertbare Proben wurden verworfen. Aus diesem Grund entbehrt die Anzahl der Proben pro Probandin einer Einheitlichkeit. 137 Proben aus den verschiedenen Arealen kamen zur Auswertung. Jedes Exzidat wurde zu zehn gleichen Teilen auf Objektträger verteilt, fixiert, beschriftet und nummeriert. Es kamen

drei verschiedene Antikörper zur Anwendung. Die Objektträger 1-4 wurden mit Antikörpern gegen Glycodelin A (N20) getestet. Die Objektträger 5-8 untersuchte ich mit Antikörpern gegen Glycodelin A (Q13). N20 ist ein polyklonaler Antikörper, welcher sich gegen die Amino-Gruppen des menschlichen Glycodelin A richtet. Q13 ist ebenfalls ein polyklonaler Antikörper, der sich gegen die Carboxy-Gruppen des Glycodelin A-Moleküls positioniert. Der Objektträger 9 wurde im Sinne einer Negativkontrolle nicht mit einem primären Antikörper versehen. Als Positivkontrolle beimpfte ich Objektträger 10 mit CA 125.

Insgesamt wertete ich für diese Arbeit 1370 Gewebeschnitte immunhistochemisch aus. Damit nimmt diese Studie hinsichtlich des Umfangs an Bearbeitungsproben im Vergleich zu Untersuchungen mit ähnlich gerichteten inhaltlichen Fragestellungen eine absolute Sonderstellung ein. Die Gefrierschnitte (Histobond®) wurden manuell (Frigocut E 2800®-eichert Jung) angefertigt. Die Schnittdicke liegt im Bereich von 5-20 µm. Bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung lagerten die Gefrierschnitte bei -80°C. Die Begutachtung der Gewebeschnitte erfolgte durch einen hinzugezogenen Pathologen.

### **2.2.1.2 Prinzipien der immunhistochemischen Reaktion**

Die immunhistochemische Antikörperreaktion führte ich mit dem Vectastain® Elite ABC-Kit (Vector Laboratories Borlingame-U.S.A.) durch. Die Avidin-Biotin-Methode beruht auf der hohen Affinität des Biotins (Vitamin H) zu Avidin (Eiklar) und dem entstehenden Farbkomplex, der genutzt werden kann. Im Gegensatz zur PAP Technik (Peroxidase-anti-Peroxidase Reaktion, beruht auf einer Antigen-Antikörper Reaktion) ist der Komplex der gewählten Methode in seiner Stabilität höher einzuschätzen. Dies liegt an der höheren Affinität des Avidins zu Biotin. Außerdem besteht eine höhere Sensibilität, da von einer Komplexbildung mehrerer enzymkonjugierter Biotin-Moleküle mit Avidin auszugehen ist. Dadurch ist es möglich die Primärantikörper stärker zu verdünnen. Das ABC-Kit nutzt die hohe Affinität des Avidins (Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 68 kDa) zu Biotin. Diese Bindung ist irreversibel. Avidin hat vier Bindungsstellen für Biotin. Die meisten Proteine (inklusive Antikörper und Enzyme) können mit speziellen Molekülen von Biotin konjugiert werden. Dabei entstehende „Biotinylierte Enzyme“ können mit Avidin zu makromolekularen Komplexen zusammengefügt werden. Der Primärantikörper bindet am Antigen. Durch die Bindung von Biotin entsteht der

Sekundärantikörper. Zuletzt folgt die makromolekulare Komplexbildung von Avidin und biotinylierter Peroxidase.<sup>142</sup>

### 2.2.1.3 Immunhistochemische Reaktion

Zunächst wurden die Gefrierschnitte in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und in 4%igem phosphatgepuffertem Formaldehyd für 10 Minuten fixiert. Dann folgte ein fünfminütiger Waschvorgang in PBS, sowie die Trocknung an der Luft. Jetzt konnte 3%iges  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 20 Minuten hinzu gegeben werden, um die endogene Peroxidase zu hemmen. Nach erneutem Waschvorgang in PBS wurde verdünntes Normal-Pferde-Serum für 20 Minuten hinzu gegeben, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Im Anschluss kam es zur Dekantierung der Schnitte. Der primäre Antikörper konnte eingesetzt werden (Tab. 9). Nach einer Stunde wurden die Gefrierschnitte für fünf Minuten in PBS gewaschen und für 30 Minuten der biotinylierte Antikörper hinzu gegeben. Erneut wurde für fünf Minuten in PBS gewaschen. Nun folgten die Zugabe des ABC-Reagenz für 30 Minuten sowie ein Waschvorgang für fünf Minuten in PBS. Um die stattgefundene Reaktion sichtbar zu machen, lösten wir eine DAB-Tablette von der Firma DAKO in 10 ml PBS. Als Startreagenz verwendeten wir konzentriertes  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Das DAB-Gemisch wurde auf die Schnitte pipettiert. Zeigte sich dann eine bräunlich sichtbare Reaktion (nach circa 10 Minuten), stoppten wir diese mittels Wasser. Im Anschluss erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. Es folgte eine alkoholische Reihe mit aufsteigend 50%igem, 75%igem und 100%igem Ethanol, sowie ein kurzes Eintauchen in Xylol. Im Anschluss deckten wir die Objektträger mit Kanadabalsam ein und versahen sie mit einem Deckglas. Alle Glycodelin A-negativen (nicht gefärbten Zellen sowie die Negativkontrolle) stellten sich blau und die positiven Zellen, sowie die Positivkontrolle braun dar. Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe des Mikroskops „Carl Zeiss Axiostar Plus“ begutachtet und in 10-facher und 40-facher Vergrößerung fotografiert. Wir verwendeten folgende Einstellungen des Mikroskops: Ph1, Ph2, Ph3, DF, H. Die Tabelle zeigt die Ansätze der Reagenzien des ABC-Kits nach Vector® (Tab. 10).



Antikörper	Details
Glycodelin (Q-13)	sc-12290; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:10 Verdünnung in PBS
Glycodelin (N-20)	sc-12289; Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 1:10 Verdünnung in PBS
CA 125	Clone Ov185:1 Cat. DLN-06578 (0,5ml Supernatant), Dianova GmbH

Tab. 9: Angewendete Antikörper

Reagenzien	Ansatz
Normal-Serum	10ml PBS + 4 Tropfen Normal Horse Serum
Biotinylierter Antikörper	10ml PBS + je 1 Tropfen Normal Horse Serum und Anti Mouse Biotinylierter Antikörper
ABC-Reagenz	5ml PBS + je 2 Tropfen Reagenz A und Reagenz B
DAB	1 Tablette DAB in 10ml PBS

Tab. 10: Ansätze der Reagenzien des ABC- Kit's nach Vector®

## 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Durchführung der PCR war es zunächst notwendig, die genetische Einheit in Form von Ribonukleinsäuren aus den entnommenen Proben zu separieren. Danach erfolgte die Messung der RNA-Konzentration mit Hilfe eines Spectrometers. Die Reverse Transkriptase schrieb die einzelsträngige RNA in doppelsträngige cDNA um. Nun wurde die Gensequenz von Glycodelin A (festgelegt durch einen spezifischen Primer) mittels PCR vervielfältigt und in der Gelelektrophorese dargestellt.

### 2.2.2.1 RNA-Extraktion

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden in einem temperierten Wasserbad (37°C) aufgetaut. Mit Hilfe des RNeasy Mini Kit® [Fa Qiagen] erfolgte die Isolierung der einzelsträngigen RNA nach Herstellerangaben. Zunächst lösten und homogenisierten wir die Proben mittels Lyse-Puffer (10 µl Mercaptoethanol auf 1 ml RLT Buffer). Die Homogenisierung erfolgte eine Minute auf dem Vortexer (Schüttel- und Mischgerät).

Danach vermischten wir die Proben mit 350 µl 70%igem Ethanol (700 µl pro Tube). Es folgte eine Übertragung auf die spin columns (im Kit enthalten). Danach wurde 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und 700 µl Puffer RW1 auf die Säule gegeben. Dann folgten die zweite Zentrifugation sowie die Entfernung des Filtrates. Zum Waschen wurde die Säule zweimal mit 500 µl RPE Puffer beladen und zentrifugiert (das erste Mal für 15 Sekunden bei 10.000 rpm, das zweite Mal für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit). Jetzt trocknete die Membran eine Minute offen und das Collection-Tube konnte durch ein Eppendorf-Tube ersetzt werden. Anschließend pipettierten wir 50 µl RNase-freies Wasser (mit DEPC behandeltes Wasser) in die Mitte der Membran. Nochmals wurde für eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. 4 µl der gewonnenen RNA wurden mit 16 µl DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt (entspricht einer Verdünnung von 1:5). Das RNA-Pellet am Grunde des Eppendorfgefäßes sollte nun bis zur Trocknung geöffnet in einer mit RNase-Away-Lösung gereinigten Kammer stehen. Nach vollständigem Trocknen und Zugabe von 50 µl DEPC-behandeltem Aqua dest. konnte die RNA-Stammlösung bei –80 °C über Monate aufbewahrt werden. Dies gewährleistet einen Schutz der labilen RNA vor unspezifischen Abbauprozessen.

#### **2.2.2.2 Mengenbestimmung der RNA**

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Spectrometers (Pharmacia Biotech) über die Messung der optischen Dichte, bei einer Absorption von 260 nm. Anhand der Extinktionswerte bei definierten Wellenlängen von 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit der RNA durch Bildung des Quotienten kontrolliert werden. Die einzelnen RNA-Lösungen wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$X [\mu\text{l}] = (\text{Endvolumen} [\mu\text{l}] \times \text{Endkonzentration} [\text{ng}/\mu\text{l}]) / \text{Ausgangskonzentration} [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

Als Leerwert-Kontrolle dienten 20 µl DEPC-behandeltes Aqua dest.

### 2.2.2.3 Reverse Transkriptase-Reaktion

Die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, schreibt die einzelsträngige RNA in doppelsträngige cDNA um. Mit Hilfe ihrer RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität synthetisiert sie einen RNA-DNA-Hybridstrang. Für den Abbau des RNA-Anteils ist der RNase-H-Anteil des Enzyms verantwortlich. Dann folgt die Vervollständigung des einzelsträngigen DNA-Stranges zum doppelsträngigen DNA-Strang durch die DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität. Der Random Primer definiert an der denaturierten, einzelsträngigen DNA den Startpunkt für die Synthese des Gegenstranges. Die doppelsträngige lineare cDNA dient in vielfacher Kopie als Ausgangsprodukt für die PCR, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Anschließend lassen sich die Produkte der RT-PCR klonieren und elektrophoretisch in einem Agarosegel auftrennen. Die RNA lagerte bis dahin auf Eis. Für die RT-Reaktion wurden 0,1 – 0,3 µg RNA verwendet, mit DEPC-Wasser ad 10 µl versetzt und 3 µl Random Primer [Fa. Invitrogen] in der Konzentration 50 ng/ µl hinzugegeben und anzentrifugiert. Es folgte die Zugabe des RT-Mastermixes (Tab. 11). Wir inkubierten zehn Minuten bei 70 °C. Die Gesamtmenge von 22 µl pro Ansatz wurde für drei Minuten auf Eis gelegt und daraufhin anzentrifugiert. Es folgten zwei weitere Inkubationsschritte von 50 Minuten bei 42 °C sowie fünf Minuten bei 95 °C. Es wurde auf Eis gekühlt und anzentrifugiert. Nachdem mit 33 µl DEPC-H<sub>2</sub>O auf 55 µl aufgefüllt wurde, folgte die Lagerung bei -20 °C, sofern die entstandene cDNA nicht sofort für die PCR benutzt wurde. Die Negativkontrolle erfolgte mit Aqua dest. anstelle von RNA.

Die Schmelztemperatur konnte nach der Wallace-Regel errechnet werden:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} (A+T) + 4^{\circ}\text{C} \times (C+G) \quad [t_m = 69^{\circ}\text{C} + 0,41 \times \text{GC\%} - 650\text{L}].$$

Der T<sub>m</sub>-Wert ist abhängig von Länge und Sequenz des Primers. Der Zyklus musste 40x wiederholt werden. Die Messungen wurden mit dem PCR HUMPEAP, Termocycler Mastergradient Eppendorf durchgeführt.

Volumen	Enzyme und Reagenzien
13 µl	RNA (0,1 - 0,3 µg RNA + DEPC-Wasser + 3 µl Random Primer)
4 µl	Starnd-Buffer (5xT-Buffer)
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	Ribo-Inhibitor (RNasin, 5 Units/µl)
1 µl	d`NTP`s Nucleotide Mix (Desoxynucleosidtriphosphate) [10 mM]
1 µl	Superscript 2 (RT)

Tab. 11: Enzyme und Reagenzien im RT-Mastermix

#### 2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Mullis et al. entwickelten eine Methode, die es ermöglicht, spezifische DNA-Sequenzen aus geringen Mengen DNA mit hoher Ausbeute zu amplifizieren. 1988 wurde diese Methode durch die Entdeckung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem Archeabakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) weiterentwickelt.<sup>143</sup> Um die Gensequenz bestimmter Proteine, wie die des Glycodelin A, darstellbar zu machen, um sie im nächsten Schritt explizit zu vervielfältigen, ist es notwendig, bestimmte Oligonukleotide (Primer) festzulegen, die im Folgenden als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase dienen. Diese Primer werden von spezialisierten Firmen angeboten, entbehren jedoch, wie in diesem Fall, der Angabe der genauen Gensequenz.

Für die Durchführung der PCR sind drei Teilschritte notwendig, die sich beliebig häufig wiederholen lassen. 1. Melting (Denaturierung oder Schmelzen), 2. Annealing (Primerhybridisierung) und 3. Elongation (Polymerisation, Verlängerung).

Zunächst werden die DNA-Doppelstränge bei 94 - 96 °C denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufgebrochen. Durch diesen Prozess (30 s bei 95 °C) wird doppelsträngige DNA (dsDNA) zu einzelsträngiger DNA (ssDNA) umgewandelt. Um sicherzustellen, dass sich im ersten Zyklus sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben, wird die DNA für längere Zeit erhitzt. Anschließend hybridisieren die spezifischen Oligonukleotid-Primer mit den Einzelsträngen der denaturierten DNA (Annealing). Synthetisch hergestellte Primer (Oligonukleotide) binden am 5'- und 3'-

Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Dafür ist eine Senkung der Temperatur für 30 Sekunden auf 55 °C, d.h. 2 - 3 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer, erforderlich. Nun ist das Enzym DNA-Polymerase in der Lage sich an die DNA-Matrize (Template) anzulagern und die Nukleotidkette mit Hilfe von freien Nukleotiden zu verlängern. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Zeit und Temperatur (72 °C für 30 Sekunden) sind von der DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und der Länge des DNA-Fragments abhängig. Eine darauf folgende Kühlung auf 4 °C zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen ist unerlässlich. Mit jedem neuen Zyklus verdoppelt sich der von den Primern eingerahmte Templateabschnitt und führt zu seiner spezifischen Amplifizierung. Es folgen wiederholte Zyklen von Einzelstrangbildung (Melting), Primeranbindung (Annealing) und Neustrangsynthese (Elongation). Diese Schritte führen zu einer exponentiellen Vermehrung des von den Primern flankierten Bereichs der Template-DNA. Das DNA-Gemisch kann bei 4 - 8 °C über Nacht aufbewahrt werden, ohne dass die DNA beschädigt wird.

Folgender Primer wurde verwendet: RT2 PCR Primer Set Human PAEP; Catalog: PPH10235A-200; Superarray Simplicity. Die Gensequenz des Primers ist firmenspezifisch.

Tabelle 12.1 gibt einen Überblick über die enthaltenen Komponenten, Tabelle 12.2 zeigt die Taktung des Mastercyclers an. Das Gesamtvolumen eines einfachen Ansatzes der PCR betrug 26 µl.

Volumen	Enzyme und Reagenzien im PCR-Mix
4,0 µl	cDNA
2,5 µl	10x PCR-Puffer (+MgCl <sup>2</sup> )
1,0 µl	d`NTP`s Nucleotide Mix (Desoxynucleosidtriphosphate) [10 mM]
1,0 µl	Primer 1 forward
1,0 µl	Primer 2 reverse
0,4 µl	Taq Polymerase
16,1 µl	H <sub>2</sub> O dest. ad

**Tab. 12.1:** Pipettierschema und Volumenangaben der Reagenzien für einen standardisierten PCR-Reaktionsansatz

Phase	Temperatur in °C	Zeit in min	
Aktivierung der Taq Polymerase	95	4	
Melting	95	30	jeweils 40 Zyklen
Annealing	55	30	
Synthese	72	30	
Elongation	72	10	
Lagerung	8	>1	

Tab. 12.2: Temperatur- und Zeitvorgaben im Thermocycler

### 2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von PCR-Produkten anhand ihres Molekulargewichtes. Verschieden große DNA-Fragmente wandern unterschiedlich schnell im Gel. Zur Ausnutzung kommt die negative Ladung der DNA. Größere DNA-Fragmente wandern langsamer in der Matrix des Agarosegels als kleinere Fragmente. Unter UV-Licht können die Fragmente durch einen Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden. Diese Farbstoffe lagern sich in die DNA ein (interkalieren) bzw. binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Als Laufpuffer diente TBE-Puffer (1:10 verdünnt). 0,8 g Agarose (Biozym) wurde mit 40 ml TBE-Puffer aufgefüllt (Tab.12.3). Diese 2%ige Lösung wurde im Mikrowellenherd (500 Watt, 3 Minuten) gekocht, bei Raumtemperatur auf 60 °C abgekühlt und dabei ständig gerührt. Nachdem das Gel seine Festigkeit erreicht hatte, gaben wir es in den TBE-Laufpuffer. Die DNA Proben wurden in die Slots (Agargel-Mini-Kammern) gegeben und eine Spannung von 100 - 120 V für 60 Minuten angelegt (Stromstärke von 400 mA). Das Agarosegel stellte ein mikroskopisch kleines Netz aus Poren dar. Unter einer UV-Lampe konnten die entstandenen Banden betrachtet werden. Die zu erwartende Fragmentlänge lag bei 218 bp. Um die Banden im Gel anzufärben, wurden 2 µl Cyaninfluoreszenzfarbstoff (SYBR Green 1) auf 498 µl

Gelladepuffer gegeben. Dieser fluoreszierende Farbstoff bindet an jegliche doppelsträngige DNA und wird durch kurzwelliges (254 nm) UV-Licht angeregt. Der Gelladepuffer zeigt somit die Trennlinien an (Abb. 7). Zur Auswertung und Dokumentation wurden die Gele mittels Polaroid Kamera fotografiert.

TBE-Puffer	Gelladepuffer
Tris 108 g	Bromphenolblau 0,25 % (w/v)
Na <sup>2</sup> -EDTA 9,3 g	Xylen Cyanol FF 0,25 % (w/v)
Borsäure 55 g	Ficoll Typ 400 15 % (w/v)
H <sub>2</sub> O 1000 ml	
pH = 8,0	

Tab. 12.3: Pufferkomponenten

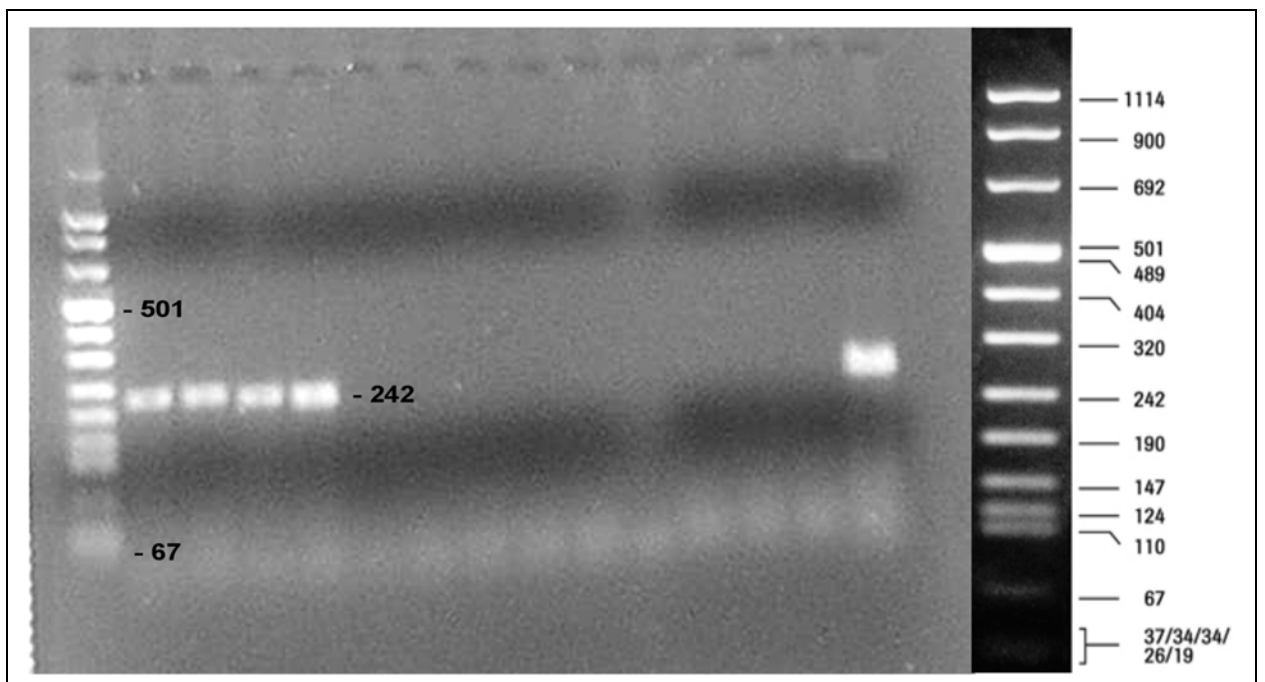


Abb. 8: Darstellung der Bandenbildung in der Gelelektrophorese. Die ersten vier Banden sowie die Bande rechts stellen positive Befunde dar.

## 2.3 Statistische Analysen

Die Verallgemeinerung von Ergebnissen eines wissenschaftlichen Experimentes, erfordert die Durchführung eines statistischen Testverfahrens. Bei den vorliegenden Ergebnissen stellte sich die Frage, ob das betreffende Ergebnis einer beliebigen Stichprobe durch den Zufall erklärbar ist, oder - und in diesem Fall spricht man von Signifikanz - ob dem nicht so ist. Aussagen, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  behaftet sind, nennt man signifikant ( $\geq 0,05$  nicht signifikant,  $< 0,01$  sehr signifikant,  $< 0,001$  hoch signifikant).

Weiterhin sollte die Sensitivität bzw. die Spezifität des Testergebnisses geprüft werden. Der Anteil der richtig positiv getesteten Patientinnen an der Gesamtzahl der Kranken erklärt die Sensitivität. Spezifität ist der Anteil der Patientinnen, bei denen der Test negativ ausgefallen ist, weil sie die Krankheit nicht haben. Mit Hilfe von ROC-Kurven wird der Zusammenhang deutlich. Die Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse des verwendeten Chi-Quadrat-Testes (Tab. 13). Die bei der statistischen Auswertung verwendeten Kenngrößen sind im Folgenden dargestellt. Zum Nachweis der Signifikanz wurden die Daten mit Hilfe des statistischen Programms SPSS (Chicago, Illinois, USA) beurteilt.<sup>144</sup>

Arithmetischer Mittelwert	Summe aller Einzelwerte $x$ , dividiert durch die Anzahl der Beobachtungen $n$
Median $M$	Mittlere Zahl einer der Größe nach geordneten Zahlenreihe; wird von höchstens der Hälfte aller Werte unterschritten bzw. überschritten
Varianz $s^2$	Summe der quadrierten Abweichungen aller einzelnen Messwerte vom arithmetischen Mittelwert $\bar{x}$ , dividiert durch die Anzahl an Beobachtungen $n$ minus eins, Mittlere quadratische Abweichung
Standardabweichung $s$	Wurzel aus der Varianz $s^2$ , mittlere Abweichung der Einzelwerte vom arithmetischen Mittelwert der Beobachtungsreihe, Maß für die Variabilität



	IHC des Primärtumors	IHC der Absiedlungsprobe des Primärtumors	PCR des Primärtumors	PCR der Absiedlungsprobe des Primärtumors
Chi square	20,669	16,762	10,411	17,496
df	3	3	3	3
Signifikanz	p<0,0005	p=0,0008	p=0,0154	p=0,0006
Contingency coeff.	0,589	0,548	0,459	0,556

Tab. 13: Chi-Quadrat-Test; (df=degrees of freedom/ Freiheitsgrad)

---

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemische Untersuchung

##### 3.1.1 Immunhistochemischer Nachweis von Glycodellin A

Die folgenden Ausführungen erläutern die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen. Bei Messungen von Glycodellin A-Werten traten Unterschiede abhängig vom Entnahmeort auf, die sich in einer breiten Variation der Messergebnisse, sowie in einer Variation des immunhistochemischen Färbeverhaltens, im so genannten Staining, ausdrückten.<sup>108</sup> Für die Begriffe Primärtumor und Absiedlungsprobe gelten die oben beschriebenen, an das jeweilige Entnahmeareal gebundenen Definitionen.

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich immunhistochemisch 1370 Gefrierschnitte von 137 Proben von 39 Patienten. Die Gewebeproben wurden mit 1 für ein positives Staining und 0 für ein nicht vorhandenes Staining bewertet. Es zeigte sich, dass 16,1% (n=23) aller immunhistochemisch untersuchten Proben ein positives Staining auf den Glycodellin A-Antikörper zeigten. 83,9% (n=114) aller Proben waren negativ (Tab.14).

Immunhistochemie des gesamten Probensatzes	1- positiv 0- negativ	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
	1	23	16,1	100,0
	0	114	83,9	83,9
gesamt:		137	100,0	

Tab. 14: Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung des gesamten Probensatzes (137 Proben von 39 Patientinnen)

##### 3.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von Glycodellin A im Gewebe der Primärtumoren

Ich untersuchte 39 Primärtumoren von 39 Patientinnen immunhistochemisch. Es wurde nur das Untersuchungsmaterial begutachtet, das mikroskopisch dem Primärtumor

entsprach. Acht der untersuchten Proben wurden mit 1 (20,5%), 31 mit 0 (79,5%) bewertet. Hierbei nahm ich noch keine Zuordnung zu einer der vier Diagnosegruppen vor. Die Standardabweichung beträgt 0,41, der Mittelwert 0,21 (Tab.15).

Immunhistochemie der Primärtumoren	1-positiv 0-negativ	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
	1	8	20,5	100,0
	0	31	79,5	79,5
gesamt:		39	100,0	

Tab. 15: Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der Primärtumoren

### 3.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe der Absiedlungsproben

Desweiteren untersuchte ich Gewebeschnitte von Absiedlungsproben. Die untersuchten Proben stammen aus folgenden anatomischen Arealen: Endometrium, Myometrium, Peritoneum, Ovar, Tube, Lymphknoten und Netz. Jedem Primärtumor wurde aus dem Pool der entnommenen Gewebeproben der Patientinnen eine Absiedlungsprobe zugeordnet und ebenfalls immunhistochemisch gegen Glycodelin A getestet. Sieben Proben wurden mit 1 (17,9%) und 32 mit 0 (82,1%) bewertet (Tab.16). Die Standardabweichung beträgt 0,39, der Mittelwert 0,18.

Immunhistochemie der Absiedlungsproben	1- positiv 0- negativ	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
	1	7	17,9	100,0
	0	32	82,1	82,1
gesamt:		39	100,0	

Tab. 16: Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der Absiedlungsproben

### 3.1.4 Immunhistochemische Betrachtung der Primärtumoren in 4 Diagnosegruppen

Ich unterteilte die Proben nach unterschiedlichen Diagnosen in vier Gruppen (Tab.17). In Gruppe 1 (Ovarialkarzinome) wurden seröse, papilläre, endometrioide, mucinöse und hellzellige Ovarialkarzinome zusammengefasst. Sieben von zehn Proben (70%) zeigten sich positiv und drei von zehn Proben (30%) negativ. Bei den negativen Proben handelte es sich um zwei endometrioide und ein seröses Ovarialkarzinom. In Gruppe 2 (Ovarialtumoren) untersuchte ich seröse, papilläre, endometrioide und mucinöse Zystadenome. Keine der acht untersuchten Proben zeigten ein positives Staining gegen Glycodelin A. In Gruppe 3 (andere Malignome) wurden Korpuserkarzinome, Zervixkarzinome, Leiomyosarkome, Teratome und Krukenbergtumoren untersucht. In einer von neun Proben (11,1%) wurde ein positiver Befund nachgewiesen. Dabei handelte es sich um ein seröses Korpuserkarzinom. In Gruppe 4 wurden Gewebeproben von Patientinnen mit Uterus myomatosus und Endometriose begutachtet. Von zwölf getesteten Proben konnte keine ein positives Staining aufweisen.

Immunhistochemie der Primärtumoren	1- pos. 0- neg.	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
Gruppe 1 (Ovarialkarzinome)	1	7	70,0	100,0
	0	3	30,0	30,0
Gruppe 2 (Ovarialtumoren)	0	8	100,0	100,0
Gruppe 3 (andere Malignome)	1	1	11,1	100,0
	0	8	88,9	88,9
Gruppe 4 (Uterus myomatosus, Endometriose)	0	12	100,0	100,0

**Tab. 17:** Auswertung der diagnosespezifischen immunhistochemischen Untersuchung der Primärtumoren

### 3.1.5 Immunhistochemische Betrachtung der Absiedlungsproben in 4 Diagnosegruppen

Im nächsten Schritt ordnete ich die immunhistochemisch untersuchten Absiedlungsproben ebenfalls den Gruppen 1 bis 4 zu (Tab.18). Sechs von zehn Absiedlungsproben (60 %) in Gruppe 1 wurden positiv gegen Glycodelin A befundet. Vier von zehn zeigten sich negativ (40 %). Dabei handelte es sich um zwei seröse und zwei endometrioide Ovarialkarzinome. Eine von acht (12 %) untersuchten Absiedlungsproben von benignen Ovarialtumoren (Gruppe 2) war positiv. Dabei handelte es sich um ein benignes Zystadenom. Sieben von acht Proben (87,5 %) wurden negativ bewertet. Keine von neun Proben der Gruppe 3 sowie keine von zwölf Proben der Gruppe 4 konnte positiv bewertet werden.

Immunhistochemie der Absiedlungsproben	1- pos. 0- neg.	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
Gruppe 1 (Ovarialkarzinome)	1	6	60,0	100,0
	0	4	40,0	40,0
Gruppe 2 (Ovarialtumoren)	1	1	12,5	100,0
	0	7	87,5	87,5
Gruppe 3 (andere Malignome)	0	9	100,0	100,0
Gruppe 4 (Uterus myomatosus, Endometriose)	0	12	100,0	100,0

Tab. 18: Auswertung der diagnosespezifischen immunhistochemischen Untersuchung der Absiedlungsproben

### 3.1.6 Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe von Ovarialkarzinomen

Ein Überblick über die immunhistochemische Auswertung zum Nachweis von Glycodelin A im Gewebe von Ovarialkarzinomen wird im Folgenden dargestellt (Tab. 19). Sieben von zehn Ovarialkarzinomen wurden hinsichtlich des immunhistochemischen Nachweises von Glycodelin A positiv, 3 von 10 negativ,

bewertet. Bei 9 von 10 in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientinnen bestanden Übereinstimmungen bezüglich des immunhistochemischen Stainings im Primärtumor und im Gewebe der Absiedlungsprobe. Es war ersichtlich, dass sechs von sieben positiv bewerteten Ovarialkarzinomen auch in der Absiedlungsprobe positive Befunde lieferten. Im Falle der negativen Primärtumoren (n=3) war auch im Gewebe der Absiedlungsprobe kein positiver Befund zu erheben. Ebenso zeigte sich, dass jeder positiv befundeten Absiedlungsprobe auch ein positiver Befund des Primärtumoren zugeordnet werden konnte. Seröse Ovarialkarzinome waren in fünf von sechs Fällen positiv. Mucinöse und hellzellige Ovarialkarzinome zeigten sich in allen Fällen positiv. Endometrioide Ovarialkarzinome konnten in zwei von zwei Fällen negativ beurteilt werden.

Abb. 8 stellt den immunhistochemischen Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines muzinösen Ovarialkarzinoms dar. Ein positives Staining wurde im Blasenperitoneum (Bild 1), im Gewebe des Primärtumoren (Bild 2) sowie im Peritoneum (Bild 3) dargestellt (Abb. 8). Abb. 9 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines hellzelligen Ovarialkarzinoms. Ein positiver Nachweis konnte im Blasendach (Bild 1), im Gewebe des Primärtumoren (Bild 2), im Peritoneum (Bild 3) und im Uterus (Bild 4) dargestellt werden (Abb. 9). Abb. 10 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines serösen Ovarialkarzinoms. Ein positiver Nachweis wurde im Gewebe des Primärtumoren (Bild 1 und 2) und im Gewebe des Dünndarmes (Bild 2 und 3) dargestellt (Abb. 10). Abb. 11 stellt den immunhistochemischen Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines serösen Ovarialkarzinoms dar. Ein positiver Nachweis konnte im Gewebe des Tumors (Bild 1) und des Peritoneums (Bild 2) dargestellt werden (Abb. 11). Abb. 12 zeigt den immunhistochemischen Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines serösen Ovarialkarzinoms. Ein positiver Nachweis wurde im Gewebe des Primärtumoren (Bilder 1 bis 3) dargestellt. Im Sinne einer Positivkontrolle verwendeten wir CA 125 als Antikörper (Abb. 12; Bild 3).

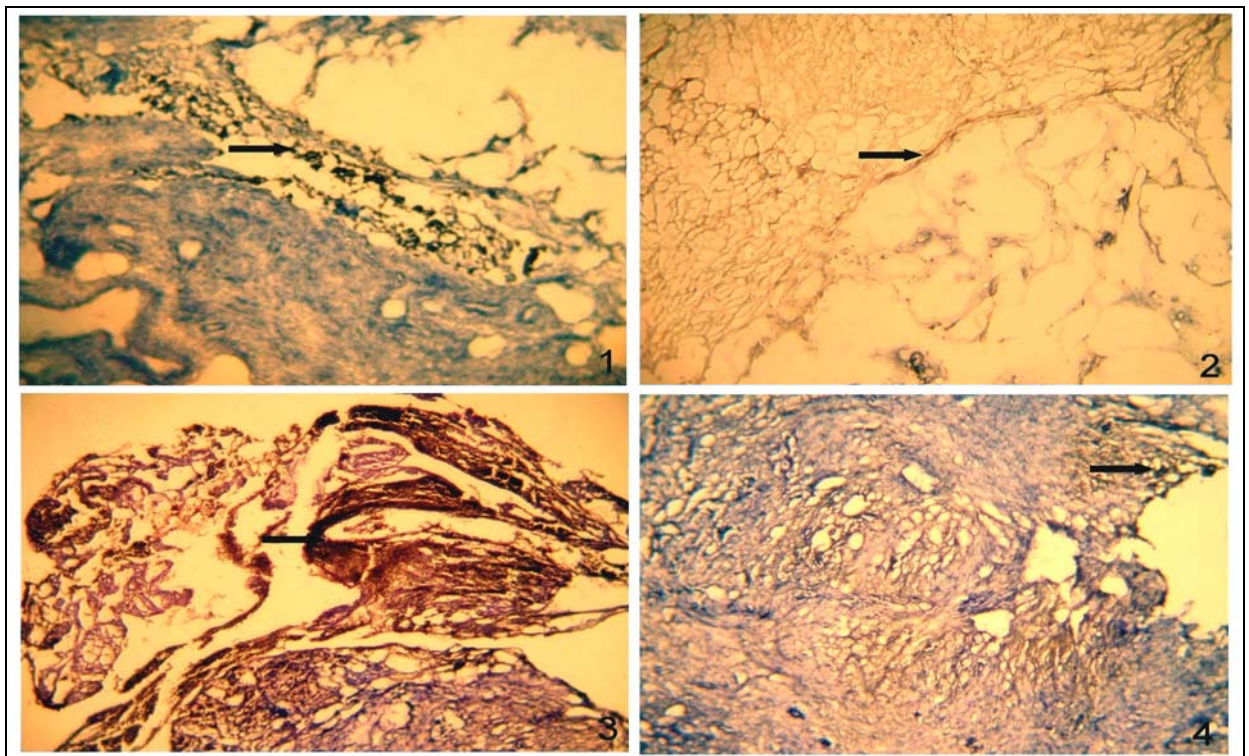
Abb. 13 stellt den immunhistochemischen Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines serösen Ovarialkarzinoms dar. Ein positiver Nachweis konnte im Gewebe des Ovars (Bild 1) und im Peritoneum (Bild 2) dargestellt werden (Abb. 14).

Die Fotos wurden mit dem Carl Zeiss Axiostar plus, in den Vergrößerungen 5x bis 40x aufgenommen. Die Einstellungen Ph1, Ph2, Ph3, DF und H wurden verwendet.

## Ergebnisse

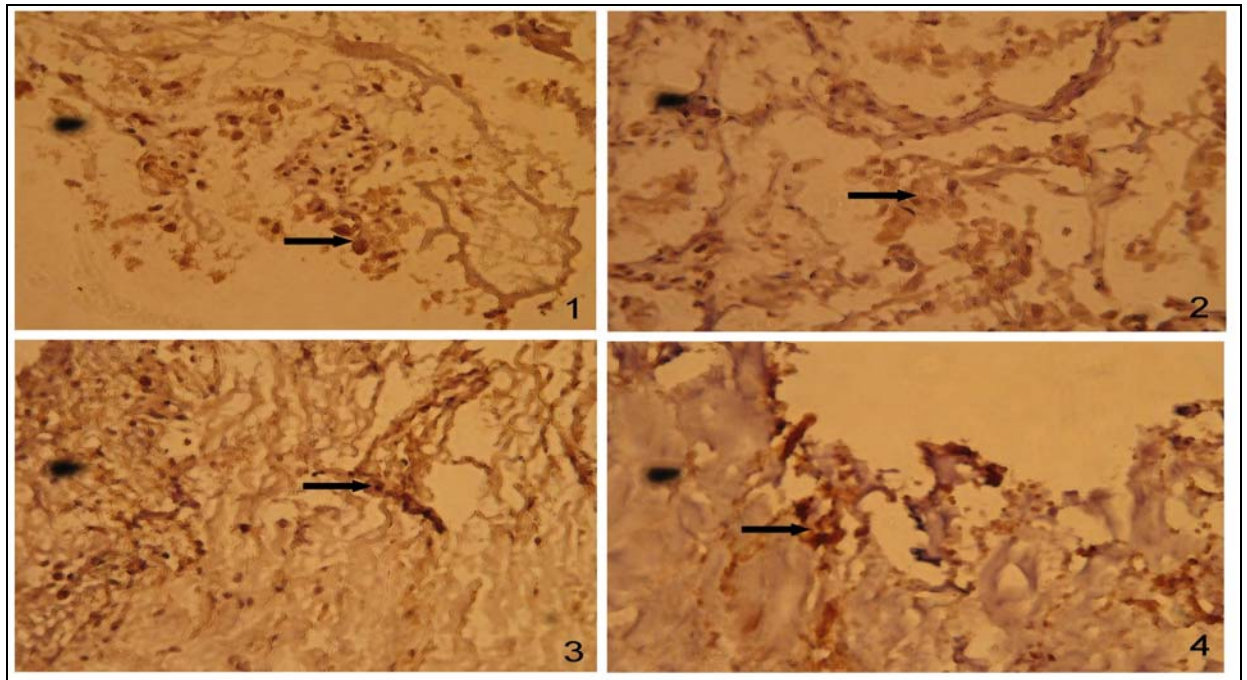
Ovarialkarzinome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Staining des Primärtumors	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
Staining der Absiedlungsprobe	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1

**Tab. 19:** Einzelaufstellung der immunhistochemisch untersuchten Ovarialkarzinome (1-6 serös, 7-8 endometrioid, 9 muzinös und 10 hellzellig; 1 für ein positives Staining, 0 für ein negatives Staining)

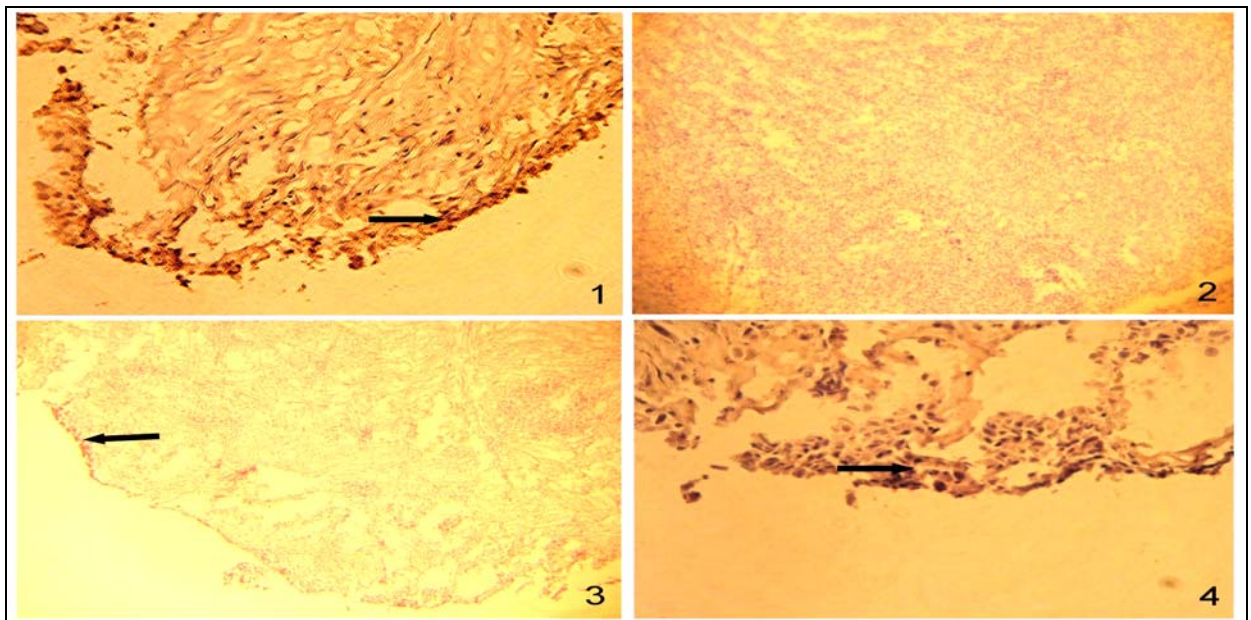


**Abb. 8:** Immunhistochemische Darstellung eines muzinösen Ovarialkarzinoms. Darstellung von Blasenperitoneum (1; 10x), Ovar (2; 10x), Peritoneum (3; 10x) und Peritoneum (4; 5x). Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert. Erkennbar sind zahlreiche Siegelringzellen, ein eindeutiger Kapseldurchbruch, sowie ein herdförmig drüsiges Gewebe.



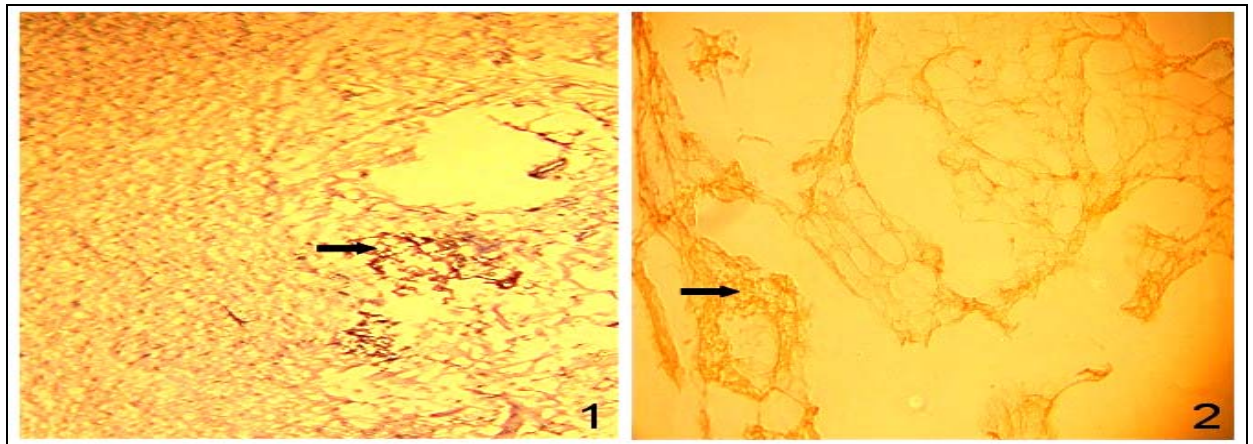


**Abb. 9:** Immunhistochemische Darstellung eines hellzelligen Ovarialkarzinoms. Darstellung von Blasendach (1, 40x), Ovar (2; 40x), Peritoneum (3; 40x) und Uterus (4; 40x). Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert. Erkennbar ist ein teils gering, teils differenziertes, teils hellzelliges Ovarialkarzinom mit klarzelligen Anteilen, Kapseldurchbruch und ausgedehnten Nekrosen, Psammomkörper, glandulär-zystische Endometriumpolypen.

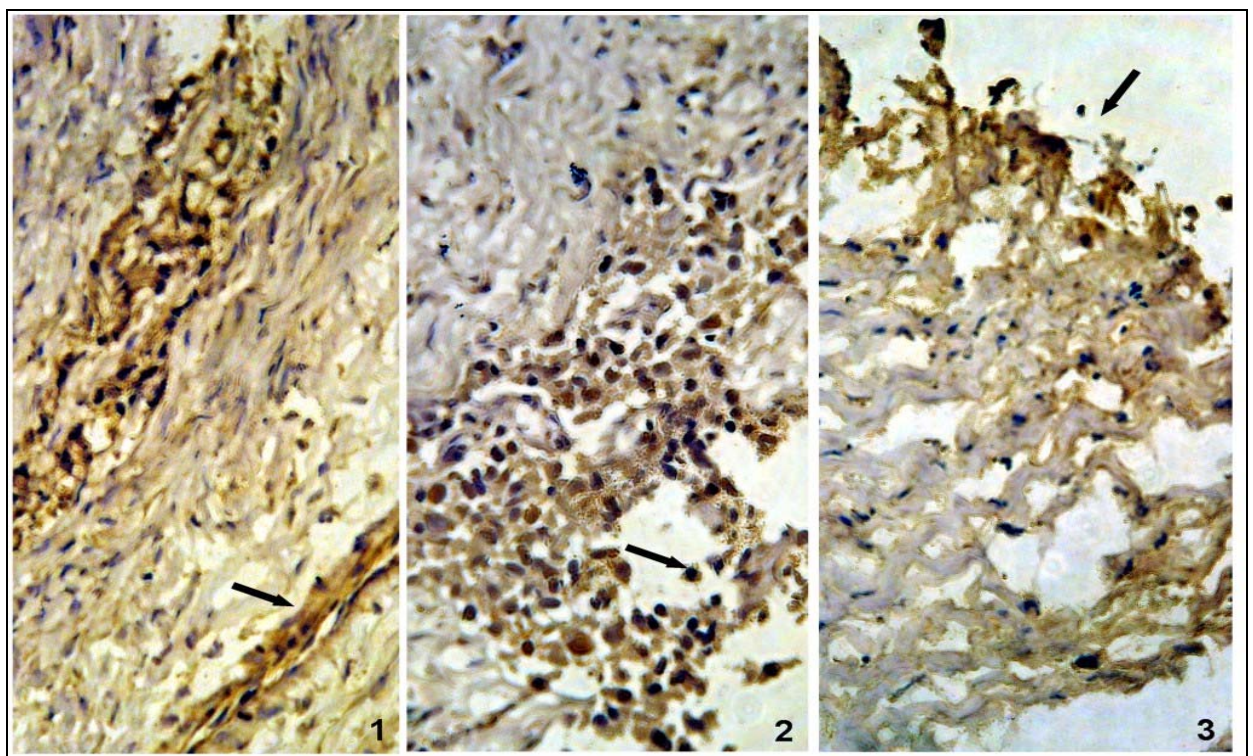


**Abb. 10:** Immunhistochemische Darstellung eines hellzelligen Ovarialkarzinoms. Darstellung der Adnexe (1; 10x und 2; 5x als Negativkontrolle), Dünndarm (3; 10x und 4; 40x). Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert. Erkennbar ist ein mäßiggradig differenziertes, metastasierendes, seröses-papilläres Ovarialkarzinom. Der Tumor ist mit der Uterusserosa zusammengewachsen.

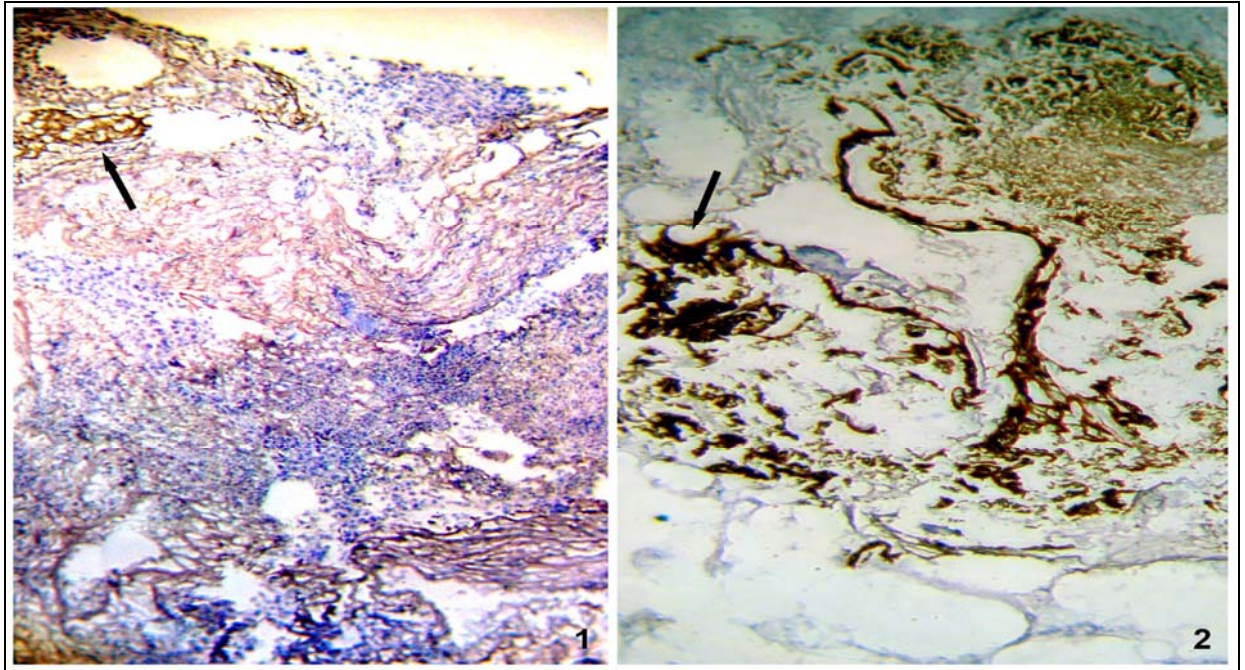




**Abb. 11:** Immunhistochemische Darstellung eines serösen Ovarialkarzinoms. Darstellung des Ovars (1; 10x) und des Peritoneums (2; 40x). Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert. Es handelt sich um ein mäßiggradiges, differenziertes, serös-papilläres Ovarialkarzinom mit Tubeneinbruch.



**Abb. 12:** Immunhistochemische Darstellung eines serösen Ovarialkarzinoms. Darstellung des Ovars. (1, 10x; 2, 30x; 3, 40x) In Bild 3 wurde der CA 125 Antikörper verwendet. Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert. Es handelt sich um ein mäßig bis gering differenziertes, seröses, teils solid trabekuläres Ovarialkarzinom.

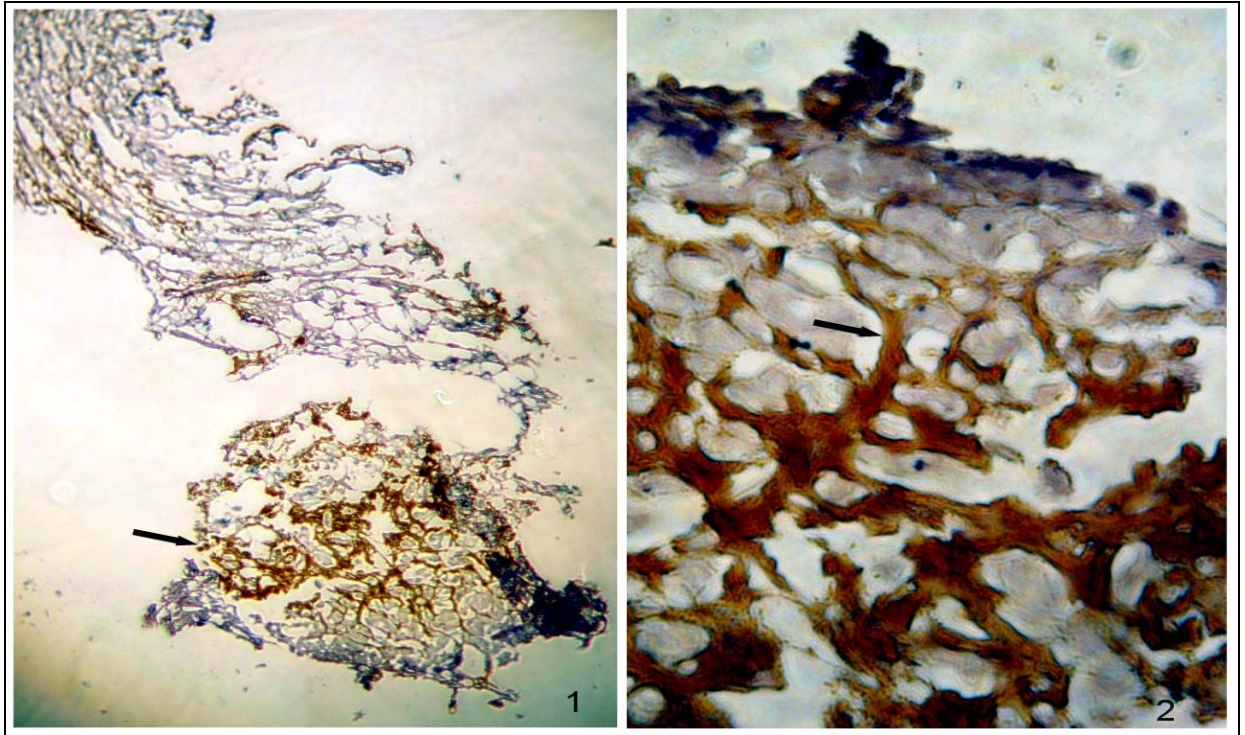


**Abb. 13:** Immunhistochemische Darstellung eines serösen Ovarialkarzinoms. Darstellung des Ovars (1, 10x) und des Peritoneums (2, 30x). Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert. Es handelt sich um ein herdförmiges, mäßiggradiges, differenziertes, serös-papilläres Ovarialkarzinom.

### 3.1.7 Immunhistochemischer Nachweis von Glycodelin A im benignen Tumorgewebe

In Abb. 14 ist der immunhistochemische Nachweis von Glycodelin A im Gewebe eines serösen Zystadenoms zu erkennen. Ein positiver Nachweis konnte im Gewebe des Tumors (Bild 1 und 2) dargestellt werden (Abb. 14). Die Fotos wurden mit dem Carl Zeiss Axiostar plus, in den Vergrößerungen 10x und 40x aufgenommen. Die Einstellungen Ph1, Ph2, Ph3, DF und H wurden verwendet.

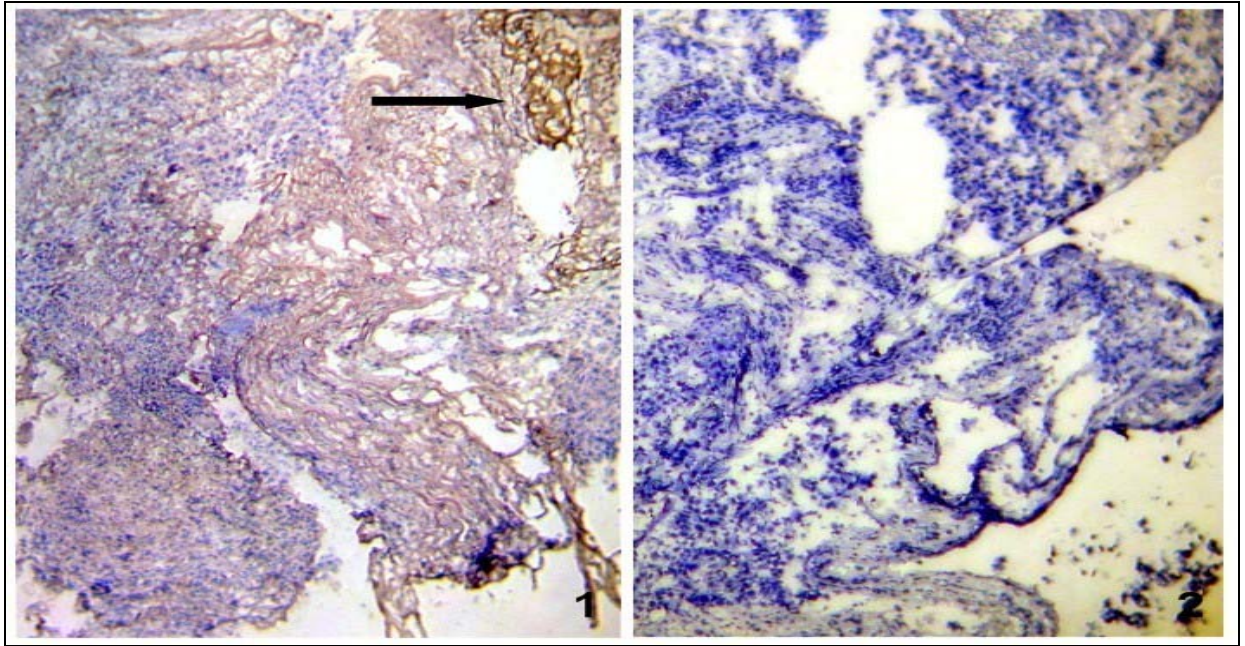




**Abb. 14:** Immunhistochemische Darstellung eines serösen, teilweise muzinösen Zystadenoms. Darstellung des Tumorgewebes (1, 10x und 2, 40x). Das immunhistochemische Staining ist mit Pfeilen markiert.

### 3.1.8 Positiv- und Negativkontrolle

Die mit Hilfe der Immunhistochemie durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von Glycodelin A im Gewebe wurden im Sinne einer Positiv- und einer Negativkontrolle überprüft. Zur Verifizierung eines richtig positiven Ergebnisses des immunhistochemischen Nachweises mit Glycodelin A-Antikörpern testeten wir dasselbe Gewebe ebenfalls mit CA 125 Antikörpern. Hierbei stellte sich ein identisches Staining auf beiden Gefrierschnitten dar. Somit ist davon auszugehen, dass die Immunhistochemie mit Glycodelin A die Zellen bzw. Zellareale einschließt, die auch mittels bewährter CA 125-Immunhistochemie erfasst werden (Abb. 12; Bild 3). Die Negativkontrolle erfolgte durch simultane Hinzugabe bzw. Auslassen des Glycodelin A-Antikörpers auf zwei zuvor als sicher positiv begutachtete Gewebeschnitte (Abb. 15; Bild 1 und 2).



**Abb. 15:** Negativkontrolle; Bild 1 (10x) zeigt Tumorgewebe eines serösen Ovarialkarzinoms mit deutlichem Staining des Glycodelin A-Antikörpers; Bild 2 (30x) zeigt den Gefrierschnitt ohne hinzugegebenen Glycodelin A-Antikörper.

### **3.2 Molekularbiologischer Nachweis von Glycodelin A im Gewebe**

#### **3.2.1 Molekularbiologische Untersuchung der Primärtumoren**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion kann der Genabschnitt von Glycodelin A abgebildet werden. Nach der Separation der Ribonukleinsäuren aus den zu untersuchenden Proben untersuchten wir die RNA-Konzentrationen mit dem Spektrometer und wandelten mit Hilfe der reversen Transkriptase einzelsträngige in doppelsträngige cDNA um. Die PCR vervielfältigte daraufhin die gesuchte Gensequenz. 137 lysierte Gewebeproben von 39 Patientinnen wurden molekularbiologisch untersucht. Zeigte sich im Anschluss ein positiver Bandenbefund in der Gelelektrophorese, konnte diese Probe mit 1 bewertet werden. Ein negativer Befund wurde mit 0 gekennzeichnet. Auch bei dieser Methode wurde der gesamte Patientenstamm untersucht.

Von diesen untersuchten 108 Proben wurden 28 mit 1 (25,9 %) und 80 mit 0 (74,1 %) bewertet (Tab. 20). Von 39 Gewebeproben der Primärtumoren zeigten 15 eine

Glycodelin A-Genexpression. Das entspricht einem Prozentsatz von 38,5 %. 24 von 39 Proben (61,5 %) wurden negativ beurteilt (Tab.21).

PCR des gesamten Probensatzes	1- positiv 0- negativ	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
	1	28	25,9	100
	0	80	74,1	74,1
gesamt:		108	100	

Tab. 20: Auswertung aller molekularbiologisch untersuchten Proben

PCR des Primärtumoren	1-positiv 0-negativ	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
	1	15	38,5	100
	0	24	61,5	61,5
gesamt:		39	100	

Tab. 21: Auswertung der molekularbiologisch untersuchten Primärtumoren

### 3.2.2 Molekularbiologische Untersuchung der Absiedlungsproben

Weiterhin untersuchte ich molekularbiologisch die Gewebeproben der Absiedlungsproben. Von 39 getesteten Proben wurden 10 mit 1 bewertet. Dies entspricht einem Prozentsatz von 25,6 %. Keine Banden zeigten sich bei 29 Proben (74,5 %) (Tab.22).

PCR der Absiedlungsproben	1- positiv 0- negativ	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
	1	10	25,6	100,0
	0	29	74,5	74,5
gesamt:		39	100,0	

Tab. 22: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Absiedlungsproben

### 3.2.3 Molekularbiologische Untersuchung der Primärtumoren in 4 Diagnosegruppen

Wir verwendeten die bereits oben beschriebene Gruppeneinteilung 1 bis 4. Dabei untersuchten wir die Primärtumoren der vier Diagnosegruppen molekularbiologisch. In Gruppe 1 (Ovarialkarzinome) wurden acht von zehn Proben (80 %) positiv, zwei von zehn Proben (20 %) negativ bewertet. Von acht Proben, die in Gruppe 2 unter benignen Ovarialtumoren zusammengefasst wurden, konnten zwei mit 1 (25 %) und sechs mit 0 (75 %) bewertet werden. In Gruppe 3 (andere Malignome) waren drei von neun Proben (33,3 %) positiv und sechs von neun Proben (66,7 %) negativ. In Gruppe 4 (Uterus myomatosus/ Endometriose) bearbeiteten wir 12 Proben, von denen zwei (16,7 %) mit 1 und zehn (83,3 %) mit 0 bewertet werden konnten (Tab. 23).

PCR der Primärtumoren	1- pos. 0- neg.	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
Gruppe 1	1	8	80,0	100,0
	0	2	20,0	20,0
Gruppe 2	1	2	25,0	100,0
	0	6	75,0	75,0
Gruppe 3	1	3	33,3	100,0
	0	6	66,7	66,7
Gruppe 4	1	2	16,7	100,0
	0	10	83,3	83,3

Tab. 23: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Primärtumoren in 4 Diagnosegruppen

### 3.2.4 Molekularbiologische Untersuchung der Absiedlungsproben in 4 Diagnosegruppen

Die gruppenspezifischen Aufarbeitung des Gewebes der Absiedlungsproben zeigte folgende Ergebnisse: In Gruppe 1 (Ovarialkarzinome) wurden sieben von zehn Proben (70 %) positiv und drei von zehn Proben (30 %) negativ bewertet. In Gruppe 2 (benigne Ovarialtumoren) zeigten alle acht getesteten Proben einen negativen Bandenbefund. In Gruppe 3 (andere Malignome) wurden drei von neun Proben (66,7 %) positiv und sechs



von neun Proben (66,7 %) negativ bewertet. In Gruppe 4 (Uterus myomatosus) zeigten alle zwölf getesteten Proben negative Befunde (Tab. 24).

PCR der Absiedlungsproben	1-pos. 0-neg.	Häufigkeit (n=)	Gültige Prozente (in %)	Kumulierte Prozente (in %)
Gruppe 1	1	7	70,0	100,0
	0	3	30,0	30,0
Gruppe 2	0	8	100,0	100,0
Gruppe 3	1	3	33,3	100,0
	0	6	66,7	66,7
Gruppe 4	0	12	100,0	100,0

Tab. 24: Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Absiedlungsproben in 4 Diagnosegruppen

### 3.2.5 Molekularbiologische Untersuchung von Glycodelin A im Gewebe von Ovarialkarzinomen

Einen Überblick über die molekularbiologische Auswertung der Ovarialkarzinome beschreibt die folgende Tabelle (Tab. 25). Wie bereits oben dargestellt, zeigte sich bei der molekularbiologischen Untersuchung der Primärtumoren eine Bandenbildung in der Gelelektrophorese bei 8 von 10 Proben (80 %). Es konnte gezeigt werden, dass 7 von 10 (70 %) Absiedlungsproben positive Ergebnisse hatten. Bei 7 von 9 Patientinnen (78 %) bestehen Übereinstimmungen zwischen Befund im Primärtumor und im Gewebe der Absiedlungsprobe. Es ist ersichtlich, dass 6 von 8 (75 %) positiv bewerteten Ovarialkarzinomen auch im Gewebe der Absiedlungsproben positive Befunde liefern. Im Falle eines negativen Primärtumors (n=2) waren im Gewebe der Absiedlungsprobe ein positiver und ein negativer Befund zu erheben. In Umkehr kann behauptet werden, dass im Falle eines positiven Befundes der Absiedlungsprobe, mit einer Ausnahme, auch der Primärtumor positiv bewertet wurde. Seröse Ovarialkarzinome waren in 4 von 6 Fällen positiv, muzinöse und hellzellige Ovarialkarzinome in allen Fällen positiv. Endometrioides Ovarialkarzinome stellten sich in 2 von 2 Fällen positiv dar. Bei 2 serösen und bei einem hellzelligen Ovarialkarzinom wurde im Gewebe der Absiedlungsprobe kein Glycodelin A nachgewiesen.

Ovarialkarzinome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PCR des Primärtumors	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
PCR der Absiedlungsprobe	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0

Tab. 25: Einzeldarstellung der molekularbiologisch untersuchten Ovarialkarzinome (1-6 serös, 7-8 endometrioid, 9 muzinös und 10 hellzellig)

### 3.2.6 Positiv- und Negativkontrolle

Die mit Hilfe der PCR durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von Glycodelin A im Gewebe wurden im Sinne einer Positiv- und einer Negativkontrolle überprüft. Zur Überprüfung eines richtig positiven Ergebnisses des molekularbiologischen Nachweises mit Glycodelin A-Antikörpern testeten wir das selbe Gewebe mit Glycodelin A-DNA Proben, die von der Firma des Kit-Anbieters geliefert wurden. Zum Nachweis eines richtig negativen Ergebnisses erfolgte die Zugabe von Aqua bidest., anstelle von Proben-DNA.



---

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welche Aussagen zur Expression von Glycodelin A beim Ovarialkarzinom getroffen werden können. Ein Vergleich der erhobenen Messwerte mit den Ergebnissen aus der Literatur wurde vorgenommen. Glycodelin A besteht aus 180 Aminosäuren und wiegt 27 - 30 kDa. Die drei Isoformen des Glycodelin sind: Glycodelin A aus der menschlichen Amnionflüssigkeit, Glycodelin S aus dem Seminalplasma und Glycodelin F aus der Follikelflüssigkeit. Im Tierversuch fanden sich in allen männlichen und weiblichen Arealen der Genitalien Glycodelin A mRNA-Expressionen. Das Glykoprotein wird hauptsächlich im sekretorischen Endometrium und in der Dezidua exprimiert. Die Produktion findet im Oberflächenepithel und speziell in Geweben mit Steroidrezeptoren statt. Glycodelin A induziert die glanduläre Morphogenese sowie Differenzierungsprozesse im Endometrium. Der Progesteroneffekt macht deutlich, dass auch Hormone die Glycodelin A-Synthese beeinflussen. Dies zeigte sich bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnahmen und signifikant höhere Glycodelin A-Spiegel aufwiesen, als Frauen, die keine progesteronhaltigen Kontrazeptiva anwendeten. Vielfach diskutiert wurde die Rolle von Glycodelin A bei der Einschätzung des Zustandes des Endometriums. Es stellte sich die Frage, ob Konzentrationsbestimmungen des Glykoproteins, Rückschlüsse auf den Differenzierungsgrad des Endometriums erlauben. Glycodelin A ist das dominante endometriale Produkt in der sekretorischen Phase und frühen Schwangerschaft. Über Konzentrationsbestimmungen könnten Aussagen über den Reifegrad des Endometrium getroffen werden.<sup>1,4,27,30,43,47,49,77</sup> Bei schwangeren Frauen, die keine Ovarien besaßen, fanden sich deutlich erniedrigte Glycodelin A-Konzentrationen. Die Glycodelin A-Produktion im Ovar galt schon früh als bewiesen. Im Ovar findet man Glycodelin A in Stroma von Rinde und Mark, in der Theka interna und in der Granulosa. Glycodelin A ist nicht tumorspezifisch, es korreliert jedoch häufiger mit Ovarialkarzinomen. Frauen mit kompliziertem Schwangerschaftsverlauf (z.B. ektope Schwangerschaften, IUGR, Tubaraborten oder HELLP-Syndrom) haben niedrigere Glycodelin A Werte als Frauen mit normalem Verlauf.<sup>89, 93</sup> Es konnte nachgewiesen werden, dass Glycodelin A-Konzentrationen bei intakter und gestörter Frühschwangerschaft signifikant unterschiedlich sind.<sup>37</sup> Fertile Frauen haben einen höheren Glycodelin A-Spiegel als postmenopausale Frauen. Klinische Studien konnten zeigen, dass normal schwangere Frauen höhere Glycodelin

A-Spiegel zeigten, als infertile Patientinnen.<sup>46</sup> Bei schwangeren Frauen zeigten sich die höchsten Glycodelin A-Konzentrationen im Fruchtwasser zwischen der 12. und 22. Schwangerschaftswoche. Im Serum schwangerer Frauen sind die höchsten Werte zwischen der 6. und 12. Woche messbar. Glycodelin A ist in der Lage, hydrophobe Moleküle, Zelloberflächenrezeptoren und lösliche Makromoleküle zu binden. Es wirkt über eine Hemmung der T-Zell-Proliferation, es hemmt die Freisetzung von Interleukin-2 und Interleukin-2-Rezeptoren von stimulierten Lymphozyten und schränkt die Aktivität von NK-Zellen ein. Auf diese Weise wirkt es immunmodulatorisch und immunsuppressiv.<sup>65,66</sup> Das Glykoprotein nimmt negativen Einfluss auf die Kapazitation durch Hemmung der Bindung des Spermiums an die Eizelle.<sup>81</sup>

Festzustellen ist, dass ein fortgeschrittenes Tumorstadium bzw. undifferenzierte Karzinome einen geringeren Glycodelin A-Spiegel aufweisen. Patientinnen mit hohen Glycodelin A-Expressionswerten haben eine bessere Prognose und höhere Überlebenschancen. Glycodelin A scheint als protektiver Faktor bei der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen.<sup>145</sup> Die Fragestellung, wie Interaktionen über das Glycoprotein zwischen Endometrium und Ovar zustande kommen, war Anstoß neuerer Untersuchungen.<sup>43</sup> Starke Glycodelin A-mRNA-Konzentrationen wurden im Tumorgewebe von Endometrium-, Ovarial- und Zervixkarzinomen festgestellt.<sup>53</sup> Es stellte sich die Frage, ob das gemessene Glycodelin A direktes Produkt der Tumorzellen war. Dieser Sachverhalt wurde in einer Studie unserer Arbeitsgruppe bewiesen, die Glycodelin A-Spiegel direkt in den Ovarialkarzinomzellen, in Zystenflüssigkeit von Ovarialkarzinomzellen und im Serum dieser Frauen verglich. Dafür entwickelte unsere Arbeitsgruppe einen Glycodelin A-ELISA. Die Ergebnisse konnten immunhistochemisch bestätigt werden. Die höchsten Werte fanden wir direkt in den Ovarialkarzinomzellen.<sup>53,45</sup> Eine genauere Differenzierung der Glycodelin A-Konzentration in Zusammenhang zur Tumorsubklassifikation bzw. die Kombination zweier Nachweisverfahren, wie PCR und Immunhistochemie, stand noch aus.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich 70% aller immunhistochemisch untersuchten Ovarialkarzinome positiv, 30% der Proben hingegen negativ. Seröse Ovarialkarzinome waren in 83%, muzinöse und hellzellige Ovarialkarzinome in 100% positiv. Alle untersuchten endometrioiden Ovarialkarzinome stellten sich immunhistochemisch negativ dar. Die erhobenen Ergebnisse bestätigen Studien, die immunhistochemisch besonders starke Glycodelin A Stainings in serösen Ovarialkarzinomen feststellten. Abweichend davon wurden jedoch in muzinösen Ovarialkarzinomen, anders als in der

vorliegenden Arbeit keine, und im Falle der hellzelligen und endometrioiden Ovarialkarzinome nur geringe immunhistochemische Stainings festgestellt.

In einer Vergleichsstudie war das Zytoplasma von serösen Ovarialkarzinom-Tumorzellen positiv für Glycodelin A, die vaskulären Endothelzellen hingegen negativ.<sup>145</sup> Die Untersuchungen bezogen sich dabei ausschließlich auf das entnommene Tumormaterial, nicht aber auf Biopsien des umliegenden Gewebes.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese zusätzlichen Areale (Absiedlungsproben) ebenfalls untersucht. Nachzuweisen war, ob Glycodelin A im Zytoplasma der Ovarialkarzinome und im Zytoplasma der Absiedlungsproben vorhanden ist, oder ob EntnahmeprozEDUREN der Biopsien zu einer Verschleppung des Glykoproteins geführt haben. Es stellte sich insbesondere die Frage, ob das immunhistochemisch gemessene Glycodelin A direkt das jeweilige Expressionsareal repräsentiert, oder ob es zu einem Transfer der Glycodelin A-mRNA gekommen ist.

Immunhistochemisch wurde Glycodelin A in den Granulosazellen, sowie in den Thekazellen des Ovar, nicht aber in den Cumuluszellen nachgewiesen. In der PCR konnte das Glykoprotein nur in den Granulosazellen, nicht aber in den Cumuluszellen nachgewiesen werden. Die Messergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass es zu einem Transport von Glycodelin A kommt. Am wahrscheinlichsten geschieht dies über die Follikelflüssigkeit, in die Glycodelin A von den Granulosazellen expremiert wird. Auch die Möglichkeit des Transportes über Gap Junctions wurde diskutiert. Nachweislich wird Glycodelin A von den Cumuluszellen modifiziert. Es ist davon auszugehen, dass die Cumuluszellen des Ovars über bisher unbekannte Rezeptoren verfügen.<sup>46</sup>

Bezüglich des immunhistochemischen Stainings im Ovarialkarzinom und im Gewebe der Absiedlungsproben bestanden bei 90% der von mir untersuchten Patientinnen Übereinstimmungen. Es stellte sich heraus, dass 86% der immunhistochemisch untersuchten Patientinnen neben einem positiv Befund im Ovarialkarzinom auch im Gewebe der Absiedlungsprobe positive Befunde lieferten. Im Falle der negativen Gewebeproben der Ovarialkarzinome war auch im Gewebe der Absiedlungsprobe kein positiver Befund zu erheben. Ebenso zeigte sich, dass jeder positiv befundeten Absiedlungsprobe auch ein positiver Befund des Ovarialkarzinoms zugeordnet werden konnte. Dies bestätigt frühere Annahmen, dass das Glykoprotein nicht nur im Ovar, sondern auch in anderen Geweben produziert wird. Die vorliegenden Untersuchungen verdeutlichen auch mit Hilfe der PCR eine Genexpression von Glycodelin A in 80% aller

Ovarialkarzinome und in 70% der jeweiligen Absiedlungsprobe der Primärtumoren. Bei 78% der Patientinnen bestehen Übereinstimmungen zwischen Befund im Primärtumor und im Gewebe der Absiedlungsprobe. Es ist ersichtlich, dass 75% der positiv bewerteten Ovarialkarzinome auch im Gewebe der Absiedlungsprobe positive Befunde liefern. In der durchgeführten PCR zeigten sich seröse Ovarialkarzinome in 67% positiv, muzinöse, endometrioide und hellzellige Ovarialkarzinome in 100% positiv. In dieser Arbeit wurde der Beweis erbracht, dass die Glycodelin A-Produktion in Primärtumor und Absiedlungsprobe korreliert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Glycodelin-A-Expression von Gewebe aus Absiedlungsproben dem Primärtumor entspricht. Bei der Fragestellung, ob es zu einem Transport von Glycodelin A über Zellgrenzen hinaus kommt oder ob Gewebe von Absiedlungsproben von Ovarialkarzinomen diesbezüglich eine Syntheseleistung innehat, sind die erhobenen Ergebnisse von Bedeutung. Sie beweisen die Fähigkeit von metastasierten Zellverbänden des Ovarialkarzinoms, eigenes Glycodelin A herzustellen. Optionale Überlegungen, das Glycoprotein könnte durch interzellulären Transport zu metastasierten bzw. abgesiedelten Zellverbänden gelangt sein, sind somit widerlegt. Die vorliegenden Untersuchungen sind von entscheidender Bedeutung in Hinblick auf Fragestellungen früherer Studien.

Es wurde bereits festgestellt, dass Glycodelin A-Konzentrationen in malignen Ovarialtumoren signifikant höher waren als in benignen Ovarialtumoren.<sup>45,53</sup> Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Ergebnisse früherer Untersuchungen, die beschrieben, dass das Ovar nicht in der Lage ist, Glycodelin A zu synthetisieren, wurden bereits in früheren Studien, sowie auch in vorliegender Arbeit widerlegt.<sup>45,53,146</sup> In dieser Arbeit wurde dieser Beweis erstmals durch die Kombination von Immunhistochemie und PCR erbracht, sowie in einer großen Anzahl von Biopsien aus unterschiedlichen anatomischen Arealen pro Patient dargestellt. Es wurde ein umfassender tabellarischer Überblick über die Glycodelin A-Synthese in diesen Arealen erstellt, der die unterschiedlichen Diagnosen und histopathologischen Besonderheiten berücksichtigt. Dadurch wird erstmals ersichtlich, dass auch Gewebe aus Absiedlungsarealen Syntheseleistungen erbringen kann, und dass Glycodelin A-Messwerte aus früheren Studien zu Ovarialkarzinomen nicht beweisend das Ovar als Hauptexpressionsareal darstellten, sondern ebenfalls Produkte eventueller Metastasen sein könnten. Immunhistochemisch konnte ein Differenzierungsverlust im Gewebe von

Abzielungsproben im Gegensatz zum Primärtumor festgestellt werden. Metastasiertes Gewebe scheint weniger Glycodelin A zu exprimieren.

Nach wie vor stellt die Diagnostik von Ovarialkarzinomen hinsichtlich des zu späten Zeitpunktes der Erstdiagnose ein Problem dar, das sich in einer hohen Sterblichkeit bei den betroffenen Patientinnen widerspiegelt. Bei über 50% der Patientinnen sind bei Erstdiagnose bereits Metastasen nachweisbar. Frühe Stadien der Erkrankung verlaufen zumeist unauffällig und klinisch kann keine Unterscheidung von benignen und malignen Tumorerkrankungen des Ovars getroffen werden. Ein operativer Eingriff stellt häufig nicht nur eine therapeutische sondern auch eine diagnostische Maßnahme dar. Dahingehend wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mehrfach Untersuchungen angestrebt, die Glycodelin A zusätzlich zu weiteren Screeningverfahren als hinweisenden Parameter bei malignen Prozessen vermuteten. Bisher konnten keine auswertbaren Ergebnisse erzielt werden, die Glycodelin A als möglichen Tumormarker beim Ovarialkarzinom thematisieren. Die erhobenen Messwerte verdeutlichen, dass bereits in frühen Stadien der Erkrankung signifikant hohe Glycodelin A-Konzentrationen gemessen werden. Die entwickelten Testverfahren sind jedoch bisher nicht standardisierbar.<sup>42,45,145</sup> Untersucht wurden Glycodelin A-Serumspiegel bei Patientinnen mit serösen und endometrioiden Ovarialkarzinomen vor dem operativen Eingriff und während der Chemotherapie. Ein direkter Zusammenhang zwischen Tumorwachstum bzw. Tumorgröße und Höhe bzw. Anstieg des Serumspiegels wurde nachgewiesen. Der Einfluss der Glycodelin A-Expression auf die Tumorgröße konnte jedoch in einer weiteren Studie nicht bestätigt werden.<sup>145</sup>

Die vorliegende Arbeit bzw. die erhobenen Messwerte können diesbezügliche Angaben nicht bewerten, weil in Einzelfällen keine auswertbaren Angaben zur Tumorgröße bzw. zur Ausdehnung des Tumorwachstums getroffen werden konnten. Die Funktion als Tumormarker wurde in einer weiteren Studie nur für seröse Ovarialkarzinome als sinnvoll erachtet.<sup>147</sup> Grundsätzlich konnte ich diese Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Wie in der Vergleichsstudie fielen endometrioide Ovarialkarzinome durch negative Befunde in der Immunhistochemie auf. Die bei der vorliegenden Untersuchung ebenfalls durchgeführte PCR zeigte bei diesen endometrioiden Ovarialkarzinomen jedoch durchweg positive Befunde.

Widersprochen werden muss außerdem der Annahme, dass benigne Ovarialkarzinome generell kein Glycodelin A produzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse erzielt, die nicht richtungsweisend für die Einführung von Glycodelin A als Marker bei

malignen Prozessen im Ovar sind. Gegen eine Funktion als Tumormarker sprechen positive Glycodelin A-Expressionswerte in den Vergleichsgruppen der Untersuchung. In den Gruppen 2, 3 und 4 wurden positive Befunde erhoben. Es stellte sich weiterhin die Frage, ob Glycodelin A in der Lage ist, die pathohistologischen Untersuchungen sowie die Bestimmung von CA 125 im Rahmen einer Tumorerkrankung, wie dem Ovarialkarzinom, zu ergänzen oder ob es für den Krankheitsverlauf bzw. für die Erhebung von Prognoseparametern von Vorteil sein könnte, den Glycodelin A-Spiegel zu messen bzw. Glycodelin A-Expressionsareale immunhistochemisch darzustellen. Einen diesbezüglichen Beweis, der derartige Untersuchungen klinisch rechtfertigen würde, konnte die vorliegende Arbeit nicht liefern.

In einer Vergleichsstudie wurden Spiegel von Glycodelin A und CA 125 in uterinen Spülflüssigkeiten sowie im Plasma untersucht. Es sollte geklärt werden, inwiefern Korrelationen, auch in Abhängigkeit zum Zyklus der Frau, bestehen. Die Autoren thematisierten die Frage, welcher Marker (Glycodelin A oder CA 125) besser für den endometrialen Status geeignet ist. Es zeigten sich simultane Anstiege ab dem 6. Tag nach Anstieg des luteinisierenden Hormons (LH+6). Der Glycodelin A-Spiegel im Plasma und in der uterinen Flüssigkeit korreliert - anders als beim CA 125 - nicht. Er ist starken Schwankungen unterlegen. Es ist jedoch eine auffällig enge Beziehung der Spiegel von CA 125 und Glycodelin A in der Uterusspülflüssigkeit messbar. Das lässt auf dieselben Kontrollfaktoren schließen. Beim Vergleich von Glycodelin A und CA 125, in Hinblick auf die Nutzung als Marker bei endometrialen Dysfunktionen, konnte dem Glycodelin A ein Vorteil eingeräumt werden, der jedoch nicht zum Beweis der Nutzung als solcher genügt.<sup>148</sup> Bisher konnte nur in der Differentialdiagnostik von Abort und ektoper Gravidität ein Nutzen von Glycodelin A als möglicher Tumormarker bewiesen werden.<sup>37</sup> Chryssikopoulos et al. untersuchten die Spiegel von Glycodelin A und CA 125 im Serum und in der Follikel-Flüssigkeit bei Patientinnen, die sich einem IVF-ET unterzogen hatten.<sup>149</sup> Es konnten zunächst keine signifikant korrelierenden Kurvenverläufe festgestellt werden. Bei der Überwachung des Behandlungserfolges stellt CA 125 einen ungenügend hilfreichen Marker dar. Kürzliche Untersuchungen bei adenomatösen Hyperplasien des Endometriums wiesen auf den Nutzen des CA 125 in diesem Bereich hin.<sup>136,150</sup> Untersucht wurde ebenfalls, wie sich Glycodelin A- und CA 12-Spiegel in Uterusspülflüssigkeiten bei normalen und stimulierten Zyklen verhalten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.<sup>151</sup> Menczer et al. betonen, dass erhöhte CA 125-Level bei Patientinnen mit Ovarialkarzinomen bereits

präoperativ hinweisend auf ein späteres Rezidiv sind. Bereits erwähnt wurde, dass Glycodelin A unter anderem in Endothelzellen von Blutgefäßen nachgewiesen wurde.<sup>152</sup> Unklarheit bestand darüber, ob es dort produziert wurde, oder über den Blutweg dorthin gelangt ist, und welche Funktion es dort übernimmt.<sup>46</sup> Neuere Untersuchungen, die die Produktion in Tumor- und Nabelschnur-Endothelzellen bewiesen, gingen der Frage nach, ob Glycodelin A im Prozess der Neovaskularisierung eines Tumors regulierende Funktionen innehat. Es wurde bewiesen, dass Glycodelin A die VEGF-Expression induziert. Es nimmt ebenfalls Einfluss darauf, wie stark Tumorzellen Angiogenese betreiben. Auch bei der Embryogenese bzw. bei der Implantation des Embryos scheint Glycodelin A neovaskulatorische Funktionen zu übernehmen.<sup>56</sup>

Immunhistochemisch konnte das Glycoprotein auch in der vorliegenden Arbeit in Endothelzellen nachgewiesen werden. Unklar bleibt, auch in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit, warum Prozesse der Angiogenese in benignen Tumoren nicht mit einer Glycodelin A-Expression einhergehen. Weiterführende Untersuchungen zur Glycodelin A–VEGF–Endothel Achse sind erforderlich.

Die Glycodelin A-Expression ist in gut differenzierten Ovarialkarzinomen (Grad I) höher als in schwach differenzierten Ovarialkarzinomen (Grad III). Ebenfalls wurden höhere Spiegel in den Frühstadien gemessen. In dieser Vergleichsstudie wurden positive Korrelationen zwischen Glycodelin A und Progesteronrezeptor-Subtypen (A und B) in Ovarialkarzinomen festgestellt. Ein Zusammenhang zum CA 125 Spiegel konnte nicht festgestellt werden.<sup>145</sup>

Von zehn in der vorliegenden Arbeit erfassten Ovarialkarzinomen wurden bei fünf Grading 2, bei vier Grading 3 und bei einem Grading 4 erhoben. Hinsichtlich der TNM Klassifikation wurden sieben Karzinome im T3, ein Karzinom im T2 und zwei Karzinome im T1 Stadium befundet. In Anlehnung an die zuvor zitierte Studie konnten in meiner Arbeit keine Korrelationen bezüglich des Gradings und des Tumorstadiums getroffen werden.

Es wurde angenommen, dass Glycodelin A einen Marker für den endometrialen Reifezustand darstellen könnte. Von unserer Arbeitsgruppe wurde ein neuer monoklonaler Antikörper gegen Glycodelin A entwickelt, welcher keine Kreuzreaktionen mit Glycodelin S, hCG und anderen Glykoproteinen der feto-maternalen Einheit zeigt. Bei diesen Untersuchungen gingen wir davon aus, dass die Höhe des Glycodelin A-Spiegels mit der jeweiligen sekretorischen bzw. proliferativen Phase korreliert. Durch Zugabe von Daidzein konnte eine signifikant erhöhte Glycodelin A-Expression

hervorgerufen werden, was anstoßend bei der Transformation von proliferativem zum sekretorischen Wachstum sein könnte.<sup>36</sup> Die Glycodelin A-Expression eines Ovarialtumors scheint Einfluss auf die 5-JÜR der Patientinnen zu haben. Wie dieser Sachverhalt zustande kommt und welchen Einfluss die negative Glycodelin A-Expression eines Tumors auf die verringerte 5-JÜR hat, ist unklar. Fest steht jedoch - gerade auf Ovarialkarzinome Grad I, Stadium III, bezogen - dass eine hohe Glycodelin A-Expression mit einer höheren 5-JÜR verbunden ist. Dahingehende Aussagen ließen sich in der vorliegenden Arbeit durch geringe Fallzahlen und die kurze Verlaufsbeobachtung nicht treffen. Die Glycodelin A-Expression steht außerdem in keinem Zusammenhang zur Tumorgröße. Auffällig ist jedoch die geringere Expression bei residualen Tumorzellen. Die Abnahme der Glycodelin A-Expression bei postmenopausalen Patientinnen bzw. der geringe Spiegel gegenüber fertilen Probandinnen scheint mit dem Rückgang der Hormonaktivität, speziell des Progesterons, assoziiert zu sein.<sup>145</sup> Da es sich bei den Patientinnen in der vorliegenden Arbeit fast ausschließlich um postmenopausale Frauen handelt, ist nicht zu eruieren, ob die geringen Glycodelin A-Expressionen speziell in den Gruppen 2 und 3 dem postmenopausalen Status geschuldet sind, oder andere Ursachen haben.

Schlussfolgernd lässt sich weiterhin feststellen, dass es eher zu keinem Transport von Glycodelin A über Zellgrenzen hinaus kommt. Gewebe von Absiedlungsproben von Ovarialkarzinomen hat eine Syntheseleistung inne. Metastasierte Zellverbände des Ovarialkarzinoms besitzen die Fähigkeit, eigenes Glycodelin A herzustellen. Ein interzellulärer Transport zu metastasierten bzw. abgesiedelten Zellverbänden scheint nicht stattzufinden.

Im Rahmen dieser Studie - und dies stellt eine Besonderheit dar - wurde zum ersten Mal ein Vergleich von molekularbiologischen und immunhistochemischen Untersuchungen angestellt. Die Beobachtungen bezogen sich nicht nur auf die unterschiedlich beschriebenen Primärtumoren, sondern auch auf die jeweiligen Absiedlungsproben. Durch die Untersuchungen in der PCR ist bewiesen worden, dass Ovarialkarzinome sowie auch deren Metastasen Glycodelin A produzieren.

Mit Hilfe groß angelegter Studien mit hohen Fallzahlen muss geklärt werden, welche genaueren Einflussgrößen auf das Glykoprotein wirken und in welchem Zusammenhang die positiven Ergebnisse, speziell in der Vergleichsgruppe, zu sehen sind.



Ausstehend ist weiterhin die Klärung, welche Rezeptoren bzw. Rezeptorsubtypen am Transport beteiligt sind. Nicht hinreichend geklärt ist die Fragestellung, warum in unterschiedlichen Tumordignitäten verschiedene Glycodelin A-Spiegel gemessen werden. Unterschiedliche Werte im Primärtumor-Gewebe und in metastasiertem Gewebe sollten Anstoß neuer Studien sein. Bei Untersuchungen zu unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten von malignen und benignen Tumorverbänden könnte der Einfluss von Glycodelin A auf die Angiogenese hinweisend sein.

---

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse sind wie folgt zusammenzufassen: In der immunhistochemischen Untersuchung waren in der Gruppe der Ovarialkarzinome sieben von zehn Proben Glycodelin A positiv. Mit der PCR wurden acht von zehn Proben positiv befundet. Eine Abhängigkeit der Ergebnisse aller Gruppen bzw. eine Zuordnung zum histopathologischen Befund, zum Differenzierungsgrad des Tumors und zum Tumorstadium war nicht möglich. Sowohl bei benignen Ovarialtumoren der Gruppe 2 (n=2), als auch bei Tumoren der Gruppe 3 (n=3) war Glycodelin A molekularbiologisch in Ausnahmefällen positiv. Immunhistochemisch war in der Gruppe 3 eine Probe positiv. Damit entfallen Tumor- und Malignitätsspezifität. Während des Metastasierungsprozesses geht die Glycodelin A-Expression, falls vorhanden, nicht verloren. Der molekularbiologisch positive Glycodelin A-Nachweis im metastasierten Gewebe beweist die eben dort lokalisierte Synthese des Glycoproteins. Immunhistochemisch deutet sich semiquantitativ eine vermehrte Expression im Vergleich zum Primärtumor an. Für eine genauere Untersuchung der Zusammenhänge sind weiterführende funktionelle Untersuchungen anzustreben. Dabei sollte ein Augenmerk auf die Untersuchung von Glycodelin A in postoperativen Serumproben gelegt werden, um die mögliche Rolle von Glycodelin A in der Tumorverlaufskontrolle aufzuklären. Hierbei scheinen in vitro-Modelle von Nutzen. Weiterhin sollte in jedem Fall die molekularbiologische Untersuchung mit PCR und immunhistochemischer Untersuchung kombiniert werden. Die Korrelation von Glycodelin A mit Ovarialkarzinomen ist bewiesen. Inwieweit zukünftig dem Glycodelin A eine Rolle als Tumormarker zukommen könnte, ist unklar und gilt bewiesen zu werden.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Kamarainen, M., Leivo, I., Koistinen, R., Julkunen, M., Karvonen, U., Rutanen, E. M., and Seppala, M. Normal human ovary and ovarian tumors express glycodeclin, a glycoprotein with immunosuppressive and contraceptive properties. *Am.J.Pathol.*, 148: 1435-1443, 1996.
2. Morrow, D. M., Xiong, N., Getty, R. R., Ratajczak, M. Z., Morgan, D., Seppala, M., Riittinen, L., Gewirtz, A. M., and Tykocinski, M. L. Hematopoietic placental protein 14. An immunosuppressive factor in cells of the megakaryocytic lineage. *Am.J.Pathol.*, 145: 1485-1495, 1994.
3. Hoozemans, D. A., Schats, R., Lambalk, C. B., Homburg, R., and Hompes, P. G. Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod.Biomed.Online.*, 9: 692-715, 2004.
4. Waites, G. T. and Bell, S. C. Immunohistological localization of human pregnancy-associated endometrial alpha 2-globulin (alpha 2-PEG), a glycosylated beta-lactoglobulin homologue, in the decidua and placenta during pregnancy. *J.Reprod.Fertil.*, 87: 291-300, 1989.
5. Li, T. C., Ling, E., Dalton, C., Bolton, A. E., and Cooke, I. D. Concentration of endometrial protein PP14 in uterine flushings throughout the menstrual cycle in normal, fertile women. *Br.J.Obstet.Gynaecol.*, 100: 460-464, 1993.
6. Seppala, M., Taylor, R. N., Koistinen, H., Koistinen, R., and Milgrom, E. Glycodeclin: a major lipocalin protein of the reproductive axis with diverse actions in cell recognition and differentiation. *Endocr.Rev.*, 23: 401-430, 2002.
7. Julkunen, M., Seppala, M., and Janne, O. A. Complete amino acid sequence of human placental protein 14: a progesterone-regulated uterine protein homologous to beta-lactoglobulins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 85: 8845-8849, 1988.

8. Julkunen, M., Koistinen, R., Sjoberg, J., Rutanen, E. M., Wahlstrom, T., and Seppala, M. Secretory endometrium synthesizes placental protein 14. *Endocrinology*, 118: 1782-1786, 1986.
  
9. Julkunen, M., Rutanen, E. M., Koskimies, A., Ranta, T., Bohn, H., and Seppala, M. Distribution of placental protein 14 in tissues and body fluids during pregnancy. *Br.J.Obstet.Gynaecol.*, 92: 1145-1151, 1985.
  
10. Seppala, M., Koistinen, H., Koistinen, R., Mandelin, E., Oehninger, S., Clark, G. F., Dell, A., and Morris, H. R. Glycodelins: role in regulation of reproduction, potential for contraceptive development and diagnosis of male infertility 1. *Hum.Reprod.*, 13 Suppl 3: 262-291, 1998.
  
11. Van Cong, N., Vaisse, C., Gross, M. S., Slim, R., Milgrom, E., and Bernheim, A. The human placental protein 14 (PP14) gene is localized on chromosome 9q34. *Hum.Genet.*, 86: 515-518, 1991.
  
12. Vaisse, C., Atger, M., Potier, B., and Milgrom, E. Human placental protein 14 gene: sequence and characterization of a short duplication. *DNA Cell Biol.*, 9: 401-413, 1990.
  
13. Chryssikopoulos, A., Mantzavinos, T., Kanakas, N., Karagouni, E., Dotsika, E., and Zourlas, P. A. Correlation of serum and follicular fluid concentrations of placental protein 14 and CA 125 in in vitro fertilization-embryo transfer patients. *Fertil.Steril.*, 66: 599-603, 1996.
  
14. Hokke, C. H. and Van den Eijnden, D. H. Enzyme-assisted synthesis of Asn-linked diantennary oligosaccharides occurring on glycodelin A. *Carbohydr.Res.*, 305: 463-468, 1997.

15. Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Panico, M., Patankar, M., Oehniger, S., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., and Clark, G. F. Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodeilin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J.Biol.Chem.*, 270: 24116-24126, 1995.
16. Jeschke, U., Wang, X., Briese, V., Friese, K., and Stahn, R. Glycodeilin and amniotic fluid transferrin as inhibitors of E-selectin-mediated cell adhesion. *Histochem.Cell Biol.*, 119: 345-354, 2003.
17. Jayachandran, R., Radcliffe, C. M., Royle, L., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and Karande, A. A. Oligosaccharides modulate the apoptotic activity of glycodeilin. *Glycobiology*, 16(11):1052-63, 2006.
18. Dutta, B., Mukhopadhyay, D., Roy, N., Das, G., and Karande, A. A. Cloning, expression, purification, and immunocharacterization of placental protein-14. *Protein Expr.Purif.*, 14: 327-334, 1998.
19. Koistinen, H., Koistinen, R., Seppala, M., Burova, T. V., Choiset, Y., and Haertle, T. Glycodeilin and beta-lactoglobulin, lipocalins with a high structural similarity, differ in ligand binding properties. *FEBS Lett.*, 450: 158-162, 1999.
20. Gaudiano, M. C., Pala, A., and Barteri, M. Structural properties of human glycodeilin A in water and in water-alcohol mixtures: a comparison with bovine beta-lactoglobulin A. *Biochim.Biophys.Acta*, 1431: 451-461, 1999.
21. Barteri, M., Gaudiano, M. C., Rotella, S., Benagiano, G., and Pala, A. Effect of pH on the structure and aggregation of human glycodeilin A. A comparison with beta-lactoglobulin A. *Biochim.Biophys.Acta*, 1479: 255-264, 2000.

22. Jeschke, U., Kuhn, C., Mylonas, I., Schulze, S., Friese, K., Mayr, D., Speer, R., Briese, V., Richter, D. U., Haase, M., and Karsten, U. Development and characterization of monoclonal antibodies for the immunohistochemical detection of glycodeilin A in decidual, endometrial and gynaecological tumour tissues. *Histopathology*, 48: 394-406, 2006.
  
23. Gao, J., Mazella, J., Seppala, M., and Tseng, L. Ligand activated hPR modulates the glycodeilin promoter activity through the Sp1 sites in human endometrial adenocarcinoma cells. *Mol.Cell Endocrinol.*, 176: 97-102, 2001.
  
24. Halttunen, M., Kamarainen, M., and Koistinen, H. Glycodeilin: a reproduction-related lipocalin. *Biochim.Biophys.Acta*, 1482: 149-156, 2000.
  
25. Chiu, P. C., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Lee, K. F., and Yeung, W. S. Zona-binding inhibitory factor-1 from human follicular fluid is an isoform of glycodeilin. *Biol.Reprod.*, 69: 365-372, 2003.
  
26. Koistinen, H., Easton, R. L., Chiu, P. C., Chalabi, S., Halttunen, M., Dell, A., Morris, H. R., Yeung, W. S., Seppala, M., and Koistinen, R. Differences in glycosylation and sperm-egg binding inhibition of pregnancy-related glycodeilin. *Biol.Reprod.*, 69: 1545-1551, 2003.
  
27. Koistinen, H., Koistinen, R., Dell, A., Morris, H. R., Easton, R. L., Patankar, M. S., Oehninger, S., Clark, G. F., and Seppala, M. Glycodeilin from seminal plasma is a differentially glycosylated form of contraceptive glycodeilin-A. *Mol.Hum.Reprod.*, 2: 759-765, 1996.
  
28. Koistinen, H., Koistinen, R., Hyden-Granskog, C., Magnus, O., and Seppala, M. Seminal plasma glycodeilin and fertilization in vitro. *J.Androl*, 21: 636-640, 2000.

29. Koistinen, H., Koistinen, R., Kamarainen, M., Salo, J., and Seppala, M. Multiple forms of messenger ribonucleic acid encoding glycodelin in male genital tract. *Lab Invest*, 76: 683-690, 1997.
30. Keil, C., Husen, B., Giebel, J., Rune, G., and Walther, R. Glycodelin mRNA is expressed in the genital tract of male and female rats (*Rattus norvegicus*). *J.Mol.Endocrinol.*, 23: 57-66, 1999.
31. Foth, D., Meisel, M., Nawroth, F., Straube, W., and Romer, T. IGFBP-1 and glycodelin serum levels before and after hysterectomy with and without bilateral oophorectomy in premenopausal women. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, 100: 55-61, 2001.
32. Shabani, N., Mylonas, I., Kunert-Keil, C., Briese, V., Janni, W., Gerber, B., Friese, K., and Jeschke, U. Expression of glycodelin in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastases. *Anticancer Res.*, 25: 1761-1764, 2005.
33. Zhou, H. M., Ramachandran, S., Kim, J. G., Raynor, D. B., Rock, J. A., and Parthasarathy, S. Implications in the management of pregnancy: II. Low levels of gene expression but enhanced uptake and accumulation of umbilical cord glycodelin. *Fertil.Steril.*, 73: 843-847, 2000.
34. Seppala, M., Yajima, M., Koistinen, R., Angervo, M., Riittinen, L., Suikkari, A. M., Selenius, P., and Julkunen, M. Endometrial proteins as local regulators of human endometrial function and their appearance in serum: clinical applications, 3. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 626: 312-320, 1991.
35. Byrjalsen, I., Thormann, L., Riis, B. J., and Christiansen, C. Secretory endometrial protein PP14 in serum from post-menopausal women receiving continuous combined oestradiol-cyproterone acetate: correlation with serum hormone concentrations and bleeding patterns. *Maturitas*, 15: 39-46, 1992.

36. Mylonas, I., Speer, R., Makovitzky, J., Richter, D. U., Briese, V., Jeschke, U., and Friese, K. Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodelin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium. *Histochem.Cell Biol.*, 114: 405-411, 2000.
  
37. Romer, T., Straube, W., Meisel, M., and Wodrig, W. [Value of serum placental protein 14 determination in differential diagnosis of abnormal early pregnancy]. *Geburtshilfe Frauenheilkd.*, 55: 490-492, 1995.
  
38. Li, T. C., Okon, M. A., Dalton, C. F., Heatley, M., and Laird, S. M. Is the measurement of placental protein-14 and CA 125 in plasma and uterine flushings useful in the evaluation of peri-menopausal and post-menopausal bleeding? *Hum.Reprod.*, 13: 2895-2901, 1998.
  
39. Hackenberg, R., Loos, S., Nia, A. H., Kunzmann, R., and Schulz, K. D. Expression of placental protein 14 by the new endometrial cancer cell line MFE-280 in vitro and by endometrial carcinomas in vivo. *Anticancer Res.*, 18: 1153-1158, 1998.
  
40. Jeschke, U., Richter, D. U., Reimer, T., Bergemann, C., Briese, V., Karsten, U., Mylonas, I., Kupka, M. S., Wiest, I., and Friese, K. Glycodelin A and differentiation of first trimester trophoblast cells in vitro. *Arch.Gynecol.Obstet.*, 272: 151-159, 2005.
  
41. Stavreus-Evers, A., Mandelin, E., Koistinen, R., Aghajnova, L., Hovatta, O., and Seppala, M. Glycodelin is present in pinopodes of receptive-phase human endometrium and is associated with down-regulation of progesterone receptor B. *Fertil.Steril.*, 85: 1803-1811, 2006.



42. Romer, T., Straube, W., and Meisel, M. [Passive immunotherapy with Venimmun for the prevention of habitual abortion--early pregnancy factor, placenta protein 12, placenta protein 14, tumor necrosis factor alpha--parameters for monitoring immunotherapy]. *Immun.Infekt.*, 22: 55-57, 1994.
43. Critchley, H. O., Chard, T., Olajide, F., Davies, M. C., Hughes, S., Wang, H. S., Lieberman, B. A., and Anderson, D. C. Role of the ovary in the synthesis of placental protein-14. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 75: 97-100, 1992.
44. Jeschke, U., Bischof, A., Speer, R., Briese, V., Richter, D. U., Bergemann, C., Mylonas, I., Shabani, N., Friese, K., and Karsten, U. Development of monoclonal and polyclonal antibodies and an ELISA for the determination of glycodelin in human serum, amniotic fluid and cystic fluid of benign and malignant ovarian tumors. *Anticancer Res.*, 25: 1581-1589, 2005.
45. Bischof, A., Briese, V., Richter, D. U., Bergemann, C., Friese, K., and Jeschke, U. Measurement of glycodelin A in fluids of benign ovarian cysts, borderline tumours and malignant ovarian cancer. *Anticancer Res.*, 25: 1639-1644, 2005.
46. Tse, J. Y., Chiu, P. C., Lee, K. F., Seppala, M., Koistinen, H., Koistinen, R., Yao, Y. Q., and Yeung, W. S. The synthesis and fate of glycodelin in human ovary during folliculogenesis. *Mol.Hum.Reprod.*, 8: 142-148, 2002.
47. Laird, S. M., Hill, C. J., Warren, M. A., Tuckerman, E. M., and Li, T. C. The production of placental protein 14 by human uterine tubal epithelial cells in culture. *Hum.Reprod.*, 10: 1346-1351, 1995.
48. Jakubowicz, D. J., Essah, P. A., Seppala, M., Jakubowicz, S., Baillargeon, J. P., Koistinen, R., and Nestler, J. E. Reduced serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein-1 in women with polycystic ovary syndrome during first trimester of pregnancy. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 89: 833-839, 2004.

49. Kamarainen, M., Miettinen, M., Seppala, M., von Boguslawsky, K., Benassi, M. S., Bohling, T., and Andersson, L. C. Epithelial expression of glycodepin in biphasic synovial sarcomas. *Int.J.Cancer*, 76: 487-490, 1998.
50. Jeschke, U., Mylonas, I., Kunert-Keil, C., Dazert, E., Shabani, N., Werling, M., Kuhn, C., Janni, W., Gerber, B., and Friese, K. Expression of glycodepin protein and mRNA in human ductal breast cancer carcinoma in situ, invasive ductal carcinomas, their lymph node and distant metastases, and ductal carcinomas with recurrence. *Oncol.Rep.*, 13: 413-419, 2005.
51. Kostadima, L., Pentheroudakis, G., Fountzilas, G., Dimopoulos, M., Pectasides, D., Gogas, H., Christodoulou, C., Samantas, E., Bafaloukos, D., Arapantoni, P., Kalofonos, H., Papakostas, P., Economopoulos, T., Bamias, A., Pavlidis, N., Stropp, U., Wirtz, R., and Hennig, G. Survivin and glycodepin transcriptional activity in node-positive early breast cancer: mRNA expression of two key regulators of cell survival. *Breast Cancer Res.Treat.*, 2006.
52. Chiu, P. C., Chung, M. K., Tsang, H. Y., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Lee, K. F., and Yeung, W. S. Glycodepin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J.Biol.Chem.*, 280: 25580-25589, 2005.
53. Horowitz, I. R., Cho, C., Song, M., Flowers, L. C., Santanam, N., Parthasarathy, S., and Ramachandran, S. Increased glycodepin levels in gynecological malignancies. *Int.J.Gynecol.Cancer*, 11: 173-179, 2001.
54. Ramachandran, S., Song, M. Q., Lowe, E., Dominguez, C. E., Parthasarathy, S., and Murphy, A. A. RU486 inhibits expression of lysophosphatidic acid induced glycodepin. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 192: 1285-1293, 2005.
55. Connor, J. P., Brudney, A., Ferrer, K., and Fazleabas, A. T. Glycodepin-A expression in the uterine cervix. *Gynecol.Oncol.*, 79: 216-219, 2000.

56. Song, M., Ramaswamy, S., Ramachandran, S., Flowers, L. C., Horowitz, I. R., Rock, J. A., and Parthasarathy, S. Angiogenic role for glycodelin in tumorigenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98: 9265-9270, 2001.
57. Jeschke, U., Kunert-Keil, C., Mylonas, I., Hammer, A., Schiessl, B., Lomba, I., Kuhn, C., Schulze, S., and Friese, K. Expression of glycodelin A in decidual tissue of preeclamptic, HELLP and intrauterine growth-restricted pregnancies. *Virchows Arch.*, 446: 360-368, 2005.
58. Skornicka, E. L., Kiyatkina, N., Weber, M. C., Tykocinski, M. L., and Koo, P. H. Pregnancy zone protein is a carrier and modulator of placental protein-14 in T-cell growth and cytokine production. *Cell Immunol.*, 232: 144-156, 2004.
59. Flower, D. R., North, A. C., and Sansom, C. E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482: 9-24, 2000.
60. Lapid, K. and Sharon, N. Meet the multifunctional and sexy glycoforms of glycodelin. *Glycobiology*, 16: 39R-45R, 2006.
61. Ish-Shalom, E., Gargir, A., Andre, S., Borovsky, Z., Ochanuna, Z., Gabius, H. J., Tykocinski, M. L., and Rachmilewitz, J. alpha2,6-Sialylation promotes binding of placental protein 14 via its Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin activity: insights into differential effects on CD45RO and CD45RA T cells. *Glycobiology*, 16: 173-183, 2006.
62. Rachmilewitz, J., Borovsky, Z., Mishan-Eisenberg, G., Yaniv, E., Riely, G. J., and Tykocinski, M. L. Focal localization of placental protein 14 toward sites of TCR engagement. *J.Immunol.*, 168: 2745-2750, 2002.
63. Mukhopadhyay, D., Sundarraj, S., Alok, A., and Karande, A. A. Glycodelin A, not glycodelin S, is apoptotically active. Relevance of sialic acid modification. *J.Biol.Chem.*, 279: 8577-8584, 2004.

64. Laird, S. M., Tuckerman, E., Li, T. C., and Bolton, A. E. Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. *Hum.Reprod.*, 9: 1339-1343, 1994.
  
65. Pockley, A. G. and Bolton, A. E. The effect of human placental protein 14 (PP14) on the production of interleukin-1 from mitogenically stimulated mononuclear cell cultures. *Immunology*, 69: 277-281, 1990.
  
66. Pockley, A. G., Mowles, E. A., Stoker, R. J., Westwood, O. M., Chapman, M. G., and Bolton, A. E. Suppression of in vitro lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin by placental protein 14. *J.Reprod.Immunol.*, 13: 31-39, 1988.
  
67. Miller, R. E., Faye, J. D., Chakraborty, S., Weber, M. C., and Tykocinski, M. L. A receptor for the lipocalin placental protein 14 on human monocytes. *FEBS Lett.*, 436: 455-460, 1998.
  
68. Yaniv, E., Borovsky, Z., Mishan-Eisenberg, G., and Rachmilewitz, J. Placental protein 14 regulates selective B cell responses. *Cell Immunol.*, 222: 156-163, 2003.
  
69. Morris, H. R., Dell, A., Easton, R. L., Panico, M., Koistinen, H., Koistinen, R., Oehninger, S., Patankar, M. S., Seppala, M., and Clark, G. F. Gender-specific glycosylation of human glycodelin affects its contraceptive activity. *J.Biol.Chem.*, 271: 32159-32167, 1996.
  
70. Clark, G. F., Dell, A., Morris, H. R., Patankar, M., Oehninger, S., and Seppala, M. Viewing AIDS from a glycobiological perspective: potential linkages to the human foetoembryonic defence system hypothesis. *Mol.Hum.Reprod.*, 3: 5-13, 1997.
  
71. Lapid, K. and Sharon, N. Meet the multifunctional and sexy glycoforms of glycodelin. *Glycobiology*, 16: 39R-45R, 2006.

72. Neurath, A. R., Jiang, S., Strick, N., Lin, K., Li, Y. Y., and Debnath, A. K. Bovine beta-lactoglobulin modified by 3-hydroxyphthalic anhydride blocks the CD4 cell receptor for HIV, 4. *Nat.Med.*, 2: 230-234, 1996.
73. Seppala, M., Jiang, S., Strick, N., Lin, K., Li, Y. Y., Koistinen, H., Koistinen, R., and Neurath, A. R. Glycodelins GdA and GdS modified by 3-hydroxyphthalic anhydride inhibit gp120-CD4 binding and HIV-1 infection in vitro. *Lab Invest*, 77: 127-130, 1997.
74. Seppala, M., Koistinen, H., and Koistinen, R. Glycodelins. *Trends Endocrinol.Metab*, 12: 111-117, 2001.
75. Mukhopadhyay, D., Sundereshan, S., Rao, C., and Karande, A. A. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J.Biol.Chem.*, 276: 28268-28273, 2001.
76. Riely, G. J., Rachmilewitz, J., Koo, P. H., and Tykocinski, M. L. alpha2-macroglobulin modulates the immunoregulatory function of the lipocalin placental protein 14. *Biochem.J.*, 351 Pt 2: 503-508, 2000.
77. Taylor, R. N., Vigne, J. L., Zhang, P., Hoang, P., Lebovic, D. I., and Mueller, M. D. Effects of progestins and relaxin on glycodelin gene expression in human endometrial cells. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 182: 841-847, 2000.
78. Oehninger, S., Coddington, C. C., Hodgen, G. D., and Seppala, M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil.Steril.*, 63: 377-383, 1995.

79. Chiu, P. C., Tsang, H. Y., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Lee, K. F., and Yeung, W. S. The contribution of D-mannose, L-fucose, N-acetylglucosamine, and selectin residues on the binding of glycodelin isoforms to human spermatozoa. *Biol.Reprod.*, 70: 1710-1719, 2004.
80. Dutta, B., Ain, R., Seshagiri, P. B., and Karande, A. A. Differential influence of recombinant non-glycosylated and glycosylated glycodelin on human sperm function: comparative studies with hamster spermatozoa. *Reprod.Fertil.Dev.*, 13: 111-118, 2001.
81. Yeung, W. S., Lee, K. F., Koistinen, R., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P. C., and Chiu, P. C. Roles of glycodelin in modulating sperm function. *Mol.Cell Endocrinol.*, 250: 149-156, 2006.
82. Shima, D. T., Kuroki, M., Deutsch, U., Ng, Y. S., Adamis, A. P., and D'Amore, P. A. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J.Biol.Chem.*, 271: 3877-3883, 1996.
83. Marti, H. H. and Risau, W. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95: 15809-15814, 1998.
84. Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am.J.Pathol.*, 146: 1029-1039, 1995.
85. Hayes, E. C., Dominguez, C. E., Voelkel, S., Song, M., Shanti, A. S., and Murphy, A. A. Effect of glycodelin on the production of vascular endothelial growth factor in cumulus cells. *Fertil.Steril.*, 85: 1553-1556, 2006.

86. Tulppala, M., Julkunen, M., Tiitinen, A., Stenman, U. H., and Seppala, M. Habitual abortion is accompanied by low serum levels of placental protein 14 in the luteal phase of the fertile cycle. *Fertil.Steril.*, 63: 792-795, 1995.
  
87. Tomczak, S., Briese, V., Kunkel, S., and Muller, H. Serum placental protein 14 (PP14) levels in patients with threatened abortion, 1. *Arch.Gynecol.Obstet.*, 258: 165-169, 1996.
  
88. Foth, D. and Romer, T. Glycodelin serum levels in women with ectopic pregnancy. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, 108: 199-202, 2003.
  
89. Mandelin, E., Koistinen, H., Koistinen, R., Affandi, B., and Seppala, M. Levonorgestrel-releasing intrauterine device-wearing women express contraceptive glycodelin A in endometrium during midcycle: another contraceptive mechanism? *Hum.Reprod.*, 12: 2671-2675, 1997.
  
90. Riittinen, L., Stenman, U. H., Alfthan, H., Suikkari, A. M., Bohn, H., and Seppala, M. Time-resolved immunofluorometric assay for placental protein 14. *Clin.Chim.Acta*, 183: 115-123, 1989.
  
91. Lalitkumar, P. G., Sengupta, J., Karande, A. A., and Ghosh, D. Placental protein 14 in endometrium during menstrual cycle and effect of early luteal phase mifepristone administration on its expression in implantation stage endometrium in the rhesus monkey. *Hum.Reprod.*, 13: 3478-3486, 1998.
  
92. Durand, M., Seppala, M., Cravioto, M. C., Koistinen, H., Koistinen, R., Gonzalez-Macedo, J., and Larrea, F. Late follicular phase administration of levonorgestrel as an emergency contraceptive changes the secretory pattern of glycodelin in serum and endometrium during the luteal phase of the menstrual cycle. *Contraception*, 71: 451-457, 2005.

93. Mandelin, E., Koistinen, H., Koistinen, R., Arola, J., Affandi, B., and Seppala, M. Endometrial expression of glycodelin in women with levonorgestrel-releasing subdermal implants. *Fertil.Steril.*, 76: 474-478, 2001.
94. Anthony, F. W., Davies, D. W., Gadd, S. C., Jenkins, J. M., Masson, G. M., Chard, T., and Perry, L. A. Lack of placental protein 14 production in pregnancy after frozen embryo transfer, down-regulation of anterior pituitary and administration of exogenous oestradiol and progesterone. *Hum.Reprod.*, 6: 737-739, 1991.
95. Baumann, C. K., Bersinger, N. A., and Birkhauser, M. H. Placental protein 14 and pregnancy-specific beta 1-glycoprotein in women with suppressed, normal and stimulated follicular maturation. *Gynecol.Endocrinol.*, 12: 231-241, 1998.
96. Arnold, J. T., Lessey, B. A., Seppala, M., and Kaufman, D. G. Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer Res.*, 62: 79-88, 2002.
97. Byrjalsen, I., Bjarnason, N. H., and Christiansen, C. Progestational effects of combinations of gestodene on the postmenopausal endometrium during hormone replacement therapy. *Am.J.Obstet.Gynecol.*, 180: 539-549, 1999.
98. Mueller, M. D., Vigne, J. L., Vaisse, C., and Taylor, R. N. Glycodelin: a pane in the implantation window. *Semin.Reprod.Med.*, 18: 289-298, 2000.
99. Jeschke, U., Briese, V., Richter, D., and Kunkel, S. [Stimulation trials of trophoblast cells in vitro using PP14]. *Z.Geburtshilfe Neonatol.*, 200: 199-201, 1996.
100. Tseng, L., Zhu, H. H., Mazella, J., Koistinen, H., and Seppala, M. Relaxin stimulates glycodeilin mRNA and protein concentrations in human endometrial glandular epithelial cells. *Mol.Hum.Reprod.*, 5: 372-375, 1999.



101. Jeschke, U., Richter, D. U., Walzel, H., Bergemann, C., Mylonas, I., Sharma, S., Keil, C., Briese, V., and Friese, K. Stimulation of hCG and inhibition of hPL in isolated human trophoblast cells in vitro by glycodelin A. *Arch.Gynecol.Obstet.*, 268: 162-167, 2003.
102. Jeschke, U., Karsten, U., Reimer, T., Richter, D. U., Bergemann, C., Briese, V., Mylonas, I., and Friese, K. Stimulation of hCG protein and mRNA in first trimester villous cytotrophoblast cells in vitro by glycodelin A. *J.Perinat.Med.*, 33: 212-218, 2005.
103. Jeschke, U., Richter, D. U., Briese, V., Mylonas, I., and Friese, K. [Stimulation of HCG, estrogen and progesterone production in isolated trophoblast cells by glycodelin A or its N-glycans]. *Z.Geburtshilfe Neonatol.*, 209: 59-64, 2005.
104. Reimer, T., Koczan, D., Briese, V., Friese, K., Richter, D., Thiesen, H. J., and Jeschke, U. Absolute quantification of human chorionic gonadotropin-beta mRNA with TaqMan detection. 4, 1. *Mol.Biotechnol.*, 14: 47-57, 2000.
105. Bergemann, C., Reimer, T., Muller, H., Hosel, A., Briese, V., Friese, K., and Jeschke, U. Stimulation of hCG protein and mRNA levels in trophoblast tumour cells Jeg3 and BeWo by glycodelin A. *Anticancer Res.*, 23: 1107-1113, 2003.
106. Seppala, M., Martikainen, H., Ronnberg, L., Riittinen, L., and Kauppila, A. Suppression of prolactin secretion during ovarian hyperstimulation is followed by elevated serum levels of endometrial protein PP14 in the late luteal phase. *Hum.Reprod.*, 4: 389-391, 1989.
107. Seppala, M., Mandelin, E., Koistinen, R., Bergholm, R., Tiikkainen, M., and Yki-Jarvinen, H. Glycodelin responses to hyperinsulinaemic clamp vary according to basal serum glycodelin concentration. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, 62: 611-615, 2005.

108. Pala, A., Padula, F., Barteri, M., Benagiano, M., Gaudiano, M. C., Moro, M., and Benagiano, G. Rapid purification and properties of human glycodelin (endometrial alpha2-globulin). J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl., 704: 25-34, 1997.
109. Beckmann, M. W., Kuscheck, B., and Schmutzler, R. K. Hereditäre Karzinomsyndrome in der Frauenheilkunde. Gynäkologie, 31: 1998.
110. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland: Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends; Gesamtprogramm zur Krebsbekämpfung. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland . 2002.
111. Kommos, F. Onkologie 4, Histologie und Prognosefaktoren. 1998.
112. Schmutzler, R. K., Beckmann, M. W., and Kiechle, M. Familiäres Mamma- und Ovarialkarzinom. deutsches Ärzteblatt 99 , S. 1372-1378. 2002.
113. Franceschi, S. Oral contraceptive use and risk of cancer of the ovary and corpus uteri. Evidence-guided prescribing of the pill.New York: Parthenon Publ.Group, S.135-144, 1996.
114. Beckmann, M. W. and Timmermann, T. Gibt es ein Populations- oder Risikogruppen-Screening für das Ovarialkarzinom? Gynäkologie 30, S.85-91, 1997.
115. Trimble, E. L. Prospects for improving staging of ovarian cancers. Lancet, 357: 159-160, 2001.
116. Hölzel, D., Klammert, A., and Schmidt, M. Krebs, Häufigkeiten, Befunde, und Behandlungsergebnisse Perspektiven für die Krebsdiskussion und eine quantitative klinisch-epidemiologische Onkologie.München: Zuckschwert Verlag, 1996.

117. Hall, H. I., Jamison, P., and Weir, H. K. Second primary ovarian cancer among women diagnosed previously with cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 10: 995-999, 2001.
  
118. Adami, H. O., Hsieh, C. C., Lambe, M., Trichopoulos, D., Leon, D., Persson, I., Ekblom, A., and Janson, P. O. Parity, age at first childbirth, and risk of ovarian cancer. *Lancet*, 344: 1250-1254, 1994.
  
119. Rodriguez, C., Patel, A. V., Calle, E. E., Jacob, E. J., and Thun, M. J. Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA*, 285: 1460-1465, 2001.
  
120. ISTO. Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen, Maligne Ovarialtumoren. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2004. W. Zuckschwerdt; München; 4.Aufl., 2004.
  
121. Horn, LC. and Krugmann, J. Histologische Klassifikation und morphologische Prognosefaktoren bei malignen Ovarialtumoren. *Gynäkologie* 117, S.335-345, 1995.
  
122. Russell, P. and Farnsworth, A. *Surgical Pathology of the ovaries*, 2 ed. New York: 1997.
  
123. Shimizu, Y., Kamoi, S., Amada, S., Akiyama, F., and Silverberg, S. G. Toward the development of a universal grading system for ovarian epithelial carcinoma: testing of a proposed system in a series of 461 patients with uniform treatment and follow-up. *Cancer*, 82: 893-901, 1998.
  
124. Yarbrow, J. W., Page, D. L., Fielding, L. P., Partridge, E. E., and Murphy, G. P. American Joint Committee on Cancer prognostic factors consensus conference. *Cancer*, 86: 2436-2446, 1999.

125. Schmidt-Matthiesen, H., Bastert, G., and Wallwiener, D. Gynäkologische Onkologie: Diagnostik, Therapie und Nachsorge- auf der Basis der AGO-Leitlinien; mit der CD-ROM "Therapie gynäkologischer Malignome. Therapieschemata und Studienprotokolle" 7. Schattauer, 2002.
  
126. Prompeler, H. J., Madjar, H., Sauerbrei, W., Lattermann, U., and Pfeleiderer, A. Diagnostic formula for the differentiation of adnexal tumors by transvaginal sonography. *Obstet.Gynecol.*, 89: 428-433, 1997.
  
127. Byrom, J., Widjaja, E., Redman, C. W., Jones, P. W., and Tebby, S. Can pre-operative computed tomography predict resectability of ovarian carcinoma at primary laparotomy? *BJOG.*, 109: 369-375, 2002.
  
128. Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., Steinberg, S. M., Mills, G. B., Simone, C., Fishman, D. A., Kohn, E. C., and Liotta, L. A. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 359: 572-577, 2002.
  
129. Baron, J. A., Gridley, G., Weiderpass, E., Nyren, O., and Linet, M. Venous thromboembolism and cancer. *Lancet*, 351: 1077-1080, 1998.
  
130. Rubin, S. C., Randall, T. C., Armstrong, K. A., Chi, D. S., and Hoskins, W. J. Ten-year follow-up of ovarian cancer patients after second-look laparotomy with negative findings. *Obstet.Gynecol.*, 93: 21-24, 1999.
  
131. Bauknecht, T., Breitbach, GP., du Bois, A, Emons, G., Grischke, EM., Jäger, W., Kommos, F., Kreienber, R., Kuhn, W., Lück, HJ., Meden, H., Meerpohl, HG., Meier, W., Pfisterer, J., Schröder, W., and Wahlstrom, T. Maligne Ovarialtumoren, kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien. Deutsche Krebsgesellschaft e.V. Qualitätssicherung in der Onkologie . 2000.

132. Colombo, N., Guthrie, D., Chiari, S., Parmar, M., Qian, W., Swart, A. M., Torri, V., Williams, C., Lissoni, A., and Bonazzi, C. International Collaborative Ovarian Neoplasm trial 1: a randomized trial of adjuvant chemotherapy in women with early-stage ovarian cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, 95: 125-132, 2003.
  
133. Markmann, Gerber, Briese, Prognostic value of ca 125 levels during primary therapy, *Anticancer Res.*, 27(4A):1837-9. 2007.
  
134. Einhorn, N., Knapp, R. C., Bast, R. C., and Zurawski, V. R., Jr. CA 125 assay used in conjunction with CA 15-3 and TAG-72 assays for discrimination between malignant and non-malignant diseases of the ovary. *Acta Oncol.*, 28: 655-657, 1989.
  
135. Nakae, M., Iwamoto, I., Fujino, T., Maehata, Y., Togami, S., Yoshinaga, M., and Douchi, T. Preoperative plasma osteopontin level as a biomarker complementary to carbohydrate antigen 125 in predicting ovarian cancer. *J.Obstet.Gynaecol.Res.*, 32: 309-314, 2006.
  
136. Rosen, D. G., Wang, L., Atkinson, J. N., Yu, Y., Lu, K. H., Diamandis, E. P., Hellstrom, I., Mok, S. C., Liu, J., and Bast, R. C., Jr. Potential markers that complement expression of CA125 in epithelial ovarian cancer. *Gynecol.Oncol.*, 99: 267-277, 2005.
  
137. Critchley, H. O., Healy, D. L., and Chard, T. Is ovarian relaxin a stimulus to placental protein 14 secretion in pregnancy? *J.Endocrinol.*, 142: 375-378, 1994.
  
138. Speer, R. Entwicklung eines Glycodelin A-lisa auf der Basis der Herstellung mono- und polyclonaler Antikörper gegen Glycodelin A. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin der medizinischen Fakultät der Universität Rostock. Rostock. 2000.

139. Hsu, S. M., Raine, L., and Fanger, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am.J.Clin.Pathol.*, 75: 816-821, 1981.
  
140. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. 1988 Jan 29;239(4839): 487-91Cetus Corporation, Department of Human Genetics, Emeryville, CA 94608.
  
141. Krenz. Statistische Analysen mit SPSS in der Medizin; Band 2; Schließende statistische Analysen.Aachen: Shaker verlag, 2005.
  
142. Mandelin, E., Lassus, H., Seppala, M., Leminen, A., Gustafsson, J. A., Cheng, G., Butzow, R., and Koistinen, R. Glycodelin in ovarian serous carcinoma: association with differentiation and survival. *Cancer Res.*, 63: 6258-6264, 2003.
  
143. Borri, P., Noci, I., Fuzzi, B., Rice, A., and Chard, T. The ovary is not a major source of placental protein 14 (glycodelin). *Hum.Reprod.*, 13: 3418-3420, 1998.
  
144. Oltenberg, A; Furgyik, S.; Placental Proteins (PP 5, PP 12 and PP14) in ovarian Tumors, 2001.
  
145. Dalton, C. F., Laird, S. M., Estdale, S. E., Saravelos, H. G., and Li, T. C. Endometrial protein PP14 and CA 125 in recurrent miscarriage patients; correlation with pregnancy outcome. *Hum.Reprod.*, 13: 3197-3202, 1998.
  
146. Chryssikopoulos, A., Mantzavinos, T., Kanakas, N., Karagouni, E., Dotsika, E., and Zourlas, P. A. Correlation of serum and follicular fluid concentrations of placental protein 14 and CA 125 in in vitro fertilization-embryo transfer patients. *Fertil.Steril.*, 66: 599-603, 1996.

147. Mylonas, I., Makovitzky, J., Richter, D. U., Jeschke, U., Briese, V., and Friese, K. Immunohistochemical expression of the tumour marker CA 125 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. *Anticancer Res.*, 23: 1075-1080, 2003.
148. Ng, E. H., Laird, S. M., Li, T. C., Yeung, W. S., and Ho, P. C. Concentrations of endometrial protein PP 14 and CA 125 in uterine flushings performed in natural and stimulated cycles. *Hum.Reprod.*, 19: 905-910, 2004.
149. Menczer, J., Chetrit, A., Sadetzki, S., Golan, A., and Levy, T. Follow-up of ovarian and primary peritoneal carcinoma: The value of physical examination in patients with pretreatment elevated CA125 levels. *Gynecol.Oncol.*, 2006.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5 Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AUP	Alphauterines Protein
Alpha 2-PEG	Schwangerschafts-abhängiges Alpha-2-Microglobulin
BLG	beta-Laktoglobulin
BRCA	Breast Cancer Gene
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
CAG-2	Chorion Alpha-2-Microglobulin
CASA	Cancer Associated Serum Antigen
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
df	degrees of freedom
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribunukleinsäure
ELISA	Enyme Linked Immuno Sorbent Assay
et al.	et alii
FIGO	Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique
g	Gramm
GdA	Glycodelin A
GdS	Glycodelin S
GdF	Glycodelin F
h	Stunden
HCG	Human Chorion-Gonadotropin
HELLP	Haemolysis Elevated Liver Low Platelet
HIV	Humanes Immundeficiency Virus



hPL	Humanes Plazentares Laktogen
IGFBP	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor Bindungsprotein
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IUGR	Intrauterine Wachstumsverzögerung
IVF-ET	In Vitro Fertilization Embryo-Transfer
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
k.A.	keine Auswertung
l	Liter
li	links
LIF	Leukozyteninhibierender Faktor
LPA	Lysophosphatic Acid
M	Molar
MCF	Mammakarzinom-Zellen
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
OPN	Osteopontin
PBMC	Peripheral Blood Mononucleare Subpopulations
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCOS	Polyzystischen Ovar Syndrom
PEM	Polymorphic Epithelial Mucin
PEP	Progestagen-abhängiges Endometriumprotein
POD	Peroxidase
PRB	Progesteron Rezeptor B
PP14	Plazentares Protein 14

PROM	Premature Rupture of Membranes
PZP	Pregnancy Zone Protein
re.	rechts
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic (-Kurve)
rpm	revolutions per minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SSW	Schwangerschaftswoche
Tab.	Tabelle
TF	Thomsen-Friedenreich-Antigen
TNF-Alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
TNM	Tumor Nodes Metastasen
UICC	International Union against Cancer
U/min	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ym	Yoctometer
z.B.	zum Beispiel
zif	Zona-binding inhibitory factor

---

## 8      **Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1:              Die zyklusabhängige Produktion von Glycodelin A
- Abb. 2:              Struktur des Glycodelin A-Moleküls
- Abb. 3:              Vergleich der Gensequenzen von Glycodelin A und  $\beta$ -Lactoglobulin
- Abb. 4:              Glycodelin A-synthetisierendes Gewebe
- Abb. 5:              Übersicht einiger Faktoren im "embryo-uterinen-Dialog"
- Abb. 6:              Krebserkrankungen nach betroffenen Organen in Prozent
- Abb. 7:              Darstellung der Bandenbildung in der Gelelektrophorese
- Abb. 8:              Immunhistochemische Darstellung eines muzinösen Ovarialkarzinoms
- Abb. 9:              Immunhistochemische Darstellung eines hellzelligen Ovarialkarzinoms (Absiedlungsproben vom Blasendach, Peritoneum und Uterus)
- Abb. 10:             Immunhistochemische Darstellung eines hellzelligen Ovarialkarzinoms (Absiedlungsprobe vom Dünndarm)
- Abb. 11:             Immunhistochemische Darstellung eines serösen Ovarialkarzinoms (Absiedlungsprobe vom Peritoneum)
- Abb. 12:             Immunhistochemische Darstellung eines serösen Ovarialkarzinoms
- Abb. 13:             Immunhistochemische Darstellung eines serösen Ovarialkarzinoms (Absiedlungsprobe vom Peritoneum)
- Abb. 14:             Immunhistochemische Darstellung eines serösen, teilweise muzinösen Zystadenoms
- Abb. 15:             Negativkontrolle

---

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Konzentrationsnachweis von Glycodelin A in verschiedenen Geweben
Tab. 2:	Glycodelin A-Synonyme und Untersuchungsmedien
Tab. 3:	Struktureller Vergleich der Glycodelin Isoformen A und S
Tab. 4:	Mittlere Glycodelin A-Konzentrationen im endometrialen Gewebe in Bezug auf die Phase der Differenzierung
Tab. 5:	Immunmodulation durch Glycodelin A
Tab. 6:	Risikofaktoren des Ovarialkarzinoms
Tab. 7:	Anzahl der Biopsien
Tab. 8:	Altersverteilung von Patientinnen mit entsprechenden Diagnosen
Tab. 9:	Angewendete Antikörper
Tab.10:	Ansätze der Reagenzien des ABC-Kit nach Vector®
Tab.11:	Enzyme und Reagenzien im RT-Mastermix
Tab. 12.1:	Pipettierschema und Volumenangaben der Reagenzien für einen standardisierten PCR-Reaktionsansatz
Tab. 12.2:	Temperatur- und Zeitvorgaben im Thermocycler
Tab. 12.3:	Pufferkomponenten
Tab. 13:	Chi-Quadrat-Test
Tab. 14:	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung des gesamten Probensatzes
Tab. 15:	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der Primärtumoren
Tab. 16:	Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der Absiedlungsproben
Tab. 17:	Auswertung der diagnosespezifischen immunhistochemischen Untersuchung der Primärtumoren
Tab. 18:	Auswertung der diagnosespezifischen immunhistochemischen Untersuchung der Absiedlungsproben
Tab. 19:	Einzelauflistung der immunhistochemisch untersuchten Ovarialkarzinome
Tab. 20:	Auswertung aller molekularbiologisch untersuchten Proben

Tab. 21:	Auswertung der molekularbiologisch untersuchten Primärtumoren
Tab. 22:	Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Absiedlungsproben
Tab. 23:	Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Primärtumoren in 4 Diagnosegruppen
Tab. 24:	Auswertung der molekularbiologischen Untersuchung der Absiedlungsproben in 4 Diagnosegruppen
Tab. 25:	Einzeldarstellung der molekularbiologisch untersuchten Ovarialkarzinome

---

## 10 Herstellerverzeichnis

### 10.1 Materialien und Geräte

Brutschrank, CO <sub>2</sub> , begast	Heraeus Instruments - Deutschland
Culture Flasks	Falcon BDL New Jersey – USA
Elektrophoresenetzgerät	Power Pac
Elektrophorese	Biorad
Eppendorftubes	Eppendorf – Hamburg - Deutschland
Faserkontrastmikroskop mit Kamera	Olympus - Japan
Mastercycler	Eppendorf – Hamburg - Deutschland
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss
Mikrotitrierplatte	MaxiSorp, Nunc, Dänemark
Petrischalen	Falcon BDL New Jersey – USA
Photokamera	Polaroid
Spectrometer	Pharmacia
SPSS	Chicago – USA
Stickstofftank (-172°C)	Heraeus Instruments - Deutschland
Thermoshaker	Lab4gen
Tiefkühlschrank (-85°C)	Heraeus Instruments - Deutschland
Tubes, steril	Falcon BDL New Jersey – USA
Wärmeschrank	Heraeus Instruments - Deutschland
Zellsiebe	Falcon BDL New Jersey – USA
Zentrifuge	Eppendorf

## 10.2 Chemikalien

Agarose	Biozym – Hamburg
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG Seromed – Berlin
CA 125 Ab-1 Cat. DLN-06578	Biotechnology Santa Cruz, USA
DEPC–Wasser	Roth – Karlsruhe
Diaminobenzidin–Tabletten	Dako – Hamburg
Ethanol	ZAP
Formaldehyd 3,7-4,0%	ZAP
Glycodelin (Q-13) sc-12290	Biotechnology Santa Cruz, USA
Glycodelin (N-20) sc-12289	Biotechnology Santa Cruz, USA
Hämalaun nach Mayer	Merck – Darmstadt
HBSS	GibcoBRL Life, Paisley - Schottland
Kanadabalsam	Merck – Darmstadt
Mercaptoethanol	Merck – Darmstadt
PAEP Primer Cat.No PPH10235A-200	Superarray
PBS	Invitrogen – Karlsruhe
Random Primer Cat.No 18418-012	Invitrogen – Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Quagen – Hilden
SYBR Green Supermix	Biorad – Hercules - CA
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector Laborat. Borlingame, USA
Xylol	Merck – Darmstadt

---

## 11 Thesen

1. Die Gensequenz für Glycodelin A liegt auf dem Chromosom 9q34. Es besteht aus 180 Aminosäuren, wiegt 27 - 30 kDa und sein Kohlenhydratanteil beträgt 17,7%.
2. Es existieren drei Isoformen des Glycodelin: Glycodelin A aus der menschlichen Amnionflüssigkeit, Glycodelin S aus dem Seminalplasma und Glycodelin F aus der Follikelflüssigkeit.
3. Neben dem Ovar und dem Endometrium sind auch andere Organe an der Expression von Glycodelin A beteiligt. Hauptbildungsorte des Glycoproteins sind jedoch das sekretorische Endometrium und die Dezidua im ersten Schwangerschaftstrimenon. Die Expression findet speziell in Geweben mit Steroidrezeptoren und dort v.a. im Oberflächenepithel statt.
4. Glycodelin A wirkt im Endometrium als zelluläres Strukturprotein, welches Differenzierungsprozesse, wie Epitheldifferenzierung und glanduläre Morphogenese induziert.
5. Ovariell gebildetes Glycodelin A wurde immunhistochemisch und molekularbiologisch in Stroma von Rinde und Mark, in der Theka interna und in der Granulosa nachgewiesen. Glycodelin A ist nicht tumorspezifisch, korreliert jedoch häufiger mit Ovarialkarzinomen.
6. Glycodelin A ist das dominante endometriale Produkt in der sekretorischen Phase und in der frühen Schwangerschaft. Konzentrationsbestimmungen dieses Proteins könnten einen einfachen Marker der endometrialen Reifung darstellen.
7. Durch Bindung hydrophober Moleküle, Bindung an Zelloberflächenrezeptoren und Bildung von Komplexen mit löslichen Makromolekülen wirkt Glycodelin A immunmodulatorisch und immunsuppressiv.



8. Glycodelin A nimmt negativen Einfluss auf die Kapazitation durch Hemmung der Bindung des Spermiums an die Zona pellucida. Seine Abwesenheit während der fertilen Phase des Menstruationszykluses im Endometrium ist mit der Existenz eines periovulatorischen Ferilisationsfensters vereinbar.
9. Glycodelin A stimuliert die Progesteron- und hCG-Produktion und wirkt so als Differenzierungsfaktor bei der Synzytiumbildung und der trophoblastären Syntheseleistung.
10. Je ungünstiger das Tumorstadium, desto geringer die Glycodelin A-Expression. Semiquantitativ wurde in den undifferenzierten Karzinomen seltener eine starke Glycodelin A-Expression nachgewiesen. Hinsichtlich der Prognose haben Patientinnen mit einer Glycodelin A-Tumorexpression höhere Überlebenschancen. Glycodelin A scheint als protektiver Faktor bei der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen.
11. Die Glycodelin A-Expression von Absiedlungsproben entspricht dem Primärtumor.
12. Für die exakte Diagnosestellung sollten Immunhistochemie und PCR zur Verifizierung von Tumor-Antigenen verknüpft werden.

---

## 12 Anhang

### Lebenslauf

Name: Matthias Bätje  
Geburtsdatum: 22.08.1979  
Geburtsort: Perleberg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung

---

1986 – 1990 Grundschole Dömitz  
1990 - 1998 Fritz Reuter Gymnasium Dömitz  
1998 Allgemeine Hochschulreife

### Wehrdienst

---

11/1998 - 08/1999 8. KFOR Sanitätsregiment Itzehoe

### Universitäre Ausbildung

---

10/1999 Immatrikulation an der Universität Rostock  
03/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/2007 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Klinische Ausbildung

---

02/2000	8-wöchiges Pflegepraktikum auf der Chirurgischen Intensivstation <i>Klinikum Südstadt Rostock (Prof. Dr. med. B. Freitag)</i>
07/2000	8-wöchiges Pflegepraktikum auf der Unfallchirurgischen Station <i>Loretto-Krankenhaus Freiburg (Prof. Dr. med. M. Kersting)</i>
04/2002	Famulatur Chirurgie <i>Universität Lembah Pantai, Kuala Lumpur, Malaysia (Prof. Tomokatsu)</i>
02/2003	Famulatur Innere Medizin <i>Stift Bethlehem Ludwigslust (Prof. Dr. med. J. Ollech-Chwoyka)</i>
02/2004	Famulatur Kinderorthopädie und Kinderchirurgie <i>CCBRT-Hospital, Dar es Salaam, Tansania (Prof. Dr. med. P. Ickler)</i>
09/04	Famulatur Allgemeinmedizin <i>Praxis für Allgemeinmedizin mit Schwerpunkt pädiatrische Prävention, Dömitz (Dr. med. B. Bätje)</i>
08/2005 – 11/2005	1. Tertial des Praktischen Jahres <i>Allgemein-, Viszeral- und Unfallchirurgie, Klinikum Südstadt Rostock (Priv.-Doz. Dr. med. habil. K. Ludwig)</i>
11/2005 – 03/2006	2. Tertial des Praktischen Jahres Wahlfach Kinderorthopädie und Kinderchirurgie, <i>Red Cross Children's Hospital, Universität Kapstadt, Südafrika (Prof. Dr. med. R.J. Diedericks)</i>
04/2006 – 08/2006	3. Tertial des Praktischen Jahres Innere Medizin <i>Endokrinologische und gastroenterologische Station, Universität Rostock (Prof. Dr. med. R. Hampel/ Prof. Dr. med. S. Liebe)</i>

Seit 11/2007

Assistenzarzt an der *Klinik für Allgemein-, Throax- und Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Rostock (Prof. Dr. med. E. Klar)*

---

## DISSERTATION

---

07/2003

Experimentelle Doktorarbeit und wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Gynäkologie der Universität Rostock unter Leitung von Prof. Dr. med. V. Briese;  
Thema: „*Glycodelin A – Genexpression und Proteinnachweis im Gewebe und Serum beim Ovarialkarzinom*“

09/2005

Publikation im Anticancer Research 27: 2023-2026 (2007) Vortrag und Posterpräsentation:  
121. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, September 2005.

---

## BEGLEITENDE MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

---

05/2002 – 08/2007

Mitarbeiter im Ambulanzdienst und der *Reisemedizinischen Beratungsstelle des ADAC*, Bad Doberan (Dr. med. R. Lösch)

1999 – 2007

Teilnahme an verschiedenen orthopädischen und kinderorthopädischen Weiterbildungsveranstaltungen, fakultative Teilnahme an Nacht- und Ambulanzdiensten in der Chirurgie

---

## QUALIFIKATIONEN + INTERESSEN

---

Sprachen:

Englisch, Französisch

Sport:

Fußball und Tennis (im Verein), Surfen, Angeln

Soziales:

Gründung des Hilfsprojektes „Ndugu Soka e.V.“

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit von mir weder bei der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ort, Datum

Matthias Bätje

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. Volker Briesse für die Überlassung des Themas und die nützlichen Hinweise und Gespräche, welche den Abschluss der vorliegenden Promotion möglich machten.

Besonderer Dank gebührt Frau Dr. Dagmar Richter für die Einführung in die Laborarbeit, für das Näherbringen der Thematik und für die vielen Diskussionen, in denen sie mir mit Rat zur Seite stand.

Für die histopathologische Begutachtung bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Makowitzki.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Claudia Richter bedanken, die bei der Durchführung der Versuchsabläufe entscheidenden Einfluss hatte und mir häufig hilfreiche Anstöße liefern konnte.

Nicht vergessen möchte ich alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Labors, die bei der Erstellung und Auswertung der Präparate hilfreich waren.

Abschließend möchte ich meinen ganz besonderen Dank gegenüber meinen Eltern zum Ausdruck bringen, die mir eine solide Ausbildung in behüteter Familie ermöglichten.